

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

Одна из главных тем физиологии заключается в изучении механизмов возбуждения и поддержания ритма сердечных сокращений. Определяющую роль в координации этих процессов играет симпатическая нервная система. Секретируемый симпатическими нейронами норадреналин, связываясь с бета-адренорецепторами, активирует синтез цАМФ и усиливает работу сердца. Менее изученным является вопрос о действии на сердце норадреналина через $\alpha 1$ -адренорецепторы. В качестве котрансмиттеров, которые также высвобождаются при активации симпатической нервной системы, выступают АТФ и другие пуриновые нуклеотиды. Их действие на сердце опосредовано пуринергическими рецепторами P2-типа. Целью диссертационной работы Яны Алексеевны Ворониной стало исследование участия $\alpha 1$ -адренорецепторов (АР) и P2-рецепторов в модуляции биоэлектрической активности синоатриального узла (САУ) и атриовентрикулярного узла (АВУ) сердца и роли в этом трансмембранного транспорта ионов хлора. Поставленные в работе конкретные задачи полностью соответствовали этой цели. Они включали определение экспрессии $\alpha 1$ -адренорецепторов, P2-рецепторов, хлорных каналов и трансмембранных переносчиков анионов хлора в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах, определение эффектов активаторов $\alpha 1$ -адренорецепторов и P2-рецепторов на сократимость сердца и

биоэлектрическую активность в отделах сердца и оценку роли хлорных каналов и транспортеров в реализации этих эффектов.

Диссертация Я.А. Ворониной написана по традиционной схеме. Во **Введении** ясно обозначена актуальность темы исследований. Прежде всего автор отмечает её важность для понимания причин развития аритмий, поскольку гиперактивность симпатического отдела вегетативной нервной системы вызывает посредством избыточной активации адренорецепторов развитие тахикардии, нарушения в работе ритмоводителя в САУ, в проведении возбуждения от предсердия к желудочку, АВ-узловые re-entry. В развитии данных патологических процессов наряду с хорошо изученным действием катехоламинов через бета-АР немаловажную роль играют $\alpha 1$ -АР и P2-рецепторы котрансмиттеров симпатических нервов, АТФ и АДФ. Отмечено, что в знаниях $\alpha 1$ -адренергической и P2-пуринергической регуляции сердечной деятельности есть пробелы, которые необходимо заполнить. Основываясь на понимании этих вопросов, Я.А. Ворониной в вводной части диссертации сформулированы конкретные задачи исследования.

В **Обзоре литературы** логично и ясно изложены современные представления о проводящей системе сердца, дано краткое описание двух типов кардиомиоцитов – сократительных и пейсмекерных, охарактеризованы системы адренергической и пуринергической регуляции, хлорные каналы и транспортеры.

В диссертационной работе Я.А. Ворониной был использован широкий набор методов, включающий получение препаратов отделов миокарда и изолированного сердца, иммунофлуоресцентное определение экспрессии в срезах рабочего миокарда и в проводящей системы сердца крысы, определение содержания мРНК, кодирующих адренорецептор $\alpha 1A$, хлорные каналы CFTR, ClC-2, Clcn3 (chloride channel 3), потенциал-зависимый хлорный канал ClC-3; Tmem16a (transmembrane member 16A), кальций-

зависимый хлорный канал TMEM16A; *Lrrc8a* (leucine rich repeat containing 8 VRAC subunit A), объем-чувствительный хлорный канал *Slc12a4* (solute carrier family 12 member 4), котранспортеры *KCC1 Slc12a2* (solute carrier family 12 member 2) и котранспортер *NKCC1*. В итоге дана развернутая качественная оценка экспрессии хлорных каналов и переносчиков. Для анализа экспрессии целевых генов был применен метод РНК-секвенирования. Следует отметить, что Я.А. Воронина провела тщательный контроль качества РНК, что говорит в пользу достоверности результатов анализа экспрессии. В сочетании с электрофизиологическими подходами применены методы определения концентрации анионов хлора с помощью флуоресцентного зонда и меркуриметрически.

В главе **Результаты** первым делом приведены данные об экспрессии $\alpha 1A$ -АР. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания показана кластерная экспрессия данных рецепторов в САУ, АВУ, пучках ГИСа. Убедительно подтверждена двойная локализация $\alpha 1A$ -АР – в сарколемме и в ядерной мембране. Далее дано описание действия фенилэфрина на функционирование САУ и АВУ.

Аналогичные исследования выполнены Я.А. Ворониной в отношении действия АТФ через P2-рецепторы. В отличие от $\alpha 1A$ -АР активация P2-АР оказывает тормозящее действие на сердце. АТФ снижает частоту сокращений сердца в экспериментах *in vivo* и при его добавлении к изолированному сердцу. Показано, что АТФ угнетает функцию АВУ, увеличивая количество АВ-блоков. Сопоставление действия разных агонистов пуринергических рецепторов свидетельствует, что эффекты на САУ опосредованы P2X-рецепторами.

Ключевые результаты диссертационной работы получены Я.А. Ворониной при изучении связи между мембранным транспортом анионов хлора и электрофизиологическими процессами в клетках синоатриального и атриовентрикулярного узлов. Автором детально исследовано действие

специфических блокаторов хлорных каналов на автоматию сердца, паттерн активации САУ в многоклеточных тканевых препаратах, на эффекты активации $\alpha 1$ -адренорецепторов в синоатриальном и атриовентрикулярном узлах. Охарактеризована экспрессия хлорных каналов, котранспортеров и обменников в разных отделах сердца. Установлено, что активация $\alpha 1$ -АР фенилэфрином вызывает увеличение концентрации хлорид-анионов в пейсмекерных клетках САУ, что сопровождается сдвигом мембранного потенциала в сторону деполяризации и в итоге приводит к увеличению частоты потенциалов действия. Яна Алексеевна показала, что рост внутриклеточной концентрации ионов хлора в тканевых препаратах САУ, происходящий при повышении осмолярности среды, сопровождается увеличением частоты возникновения спонтанных потенциалов действия. Следует однако отметить, что при описании этого конкретного эксперимента не хватает четкости. В тексте указано, что препарат сначала помещался в гипотоническую среду, а потом проводилась замена среды на изотоническую, что приводило к снижению флуоресценции зонда в результате подъема $[Cl^-]$ в цитоплазме. Но на рис.44Г среда обозначена как гиперосмотическая. В подписи к рисунку и в тексте не приведен состав гипоосмотической среды, не указано, изменялась ли концентрация ионов хлора в среде при изменении её осмолярности.

Интересные данные получены при оценке действия фенилэфрина на частоту потенциалов действия в условиях изменения осмолярности внеклеточной среды. Обнаружено, что активация $\alpha 1A$ -АР устраняет вызванное гипоосмолярностью снижение частоты ПД. При этом изменяется паттерн активации в САУ в сторону увеличения площади области возбуждения и сдвигом точки первичной активации.

В заключительной части работы Я.А. Воронина исследовала действие блокатора хлорной проводимости пробеницида и не выявила его влияния на частоту спонтанных ПД в САУ кролика в отсутствие и в присутствии АТФ.

Но в отличие от этого, пробеницид почти полностью устранял блокирующее действие АТФ на атриовентрикулярную проводимость.

Таким образом, Я.А. Ворониной выполнена большая по объему исследовательская работа. Получены оригинальные данные, имеющие фундаментальное значение. В то же время при подготовке диссертации допущены некоторые погрешности. На стр.17, где описывается пуринергическая регуляция работы сердца, Я.А. Воронина цитирует работу [Burnstock, Dumsday, Smythe, 1972] как основополагающую и в дальнейшем ссылается на другие статьи этого автора. Мне кажется, уместно было бы упомянуть более ранние работы ещё начала 60-х годов учеников Х.С.Коштоянца – Турпаева Т.М., Нистратовой С.Н., Путинцевой Т.Г., Сахарова Д.А. (ЖЭБФ 1965, Т.1, №6, С.500-506; доклады на Конференциях, посвященных 75-летию акад. А.Д. Сперанского, 1963 г. и посвященной памяти акад. Л.А. Орбели, 1963 г.), в которых описано действие АТФ на холинергическую регуляцию сердца. Есть отдельные замечания по оформлению рисунков. В частности, на рис.16Г и рис.20А не приведены оси ординат. Из описания опыта, представленного на рис.20 остается не ясным, как и в каких дозах вводили АТФ и другие вещества крысам *in vivo* при регистрации ЭКГ. Есть одна терминологическая ошибка. Надо писать инозитолтрифосфат, а не трифосфат. Эти замечания не являются критическими и не умаляют научной значимости диссертационной работы Я.А. Ворониной.

Подводя итог вышеизложенному можно заключить, что диссертация Я.А. Ворониной 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. Соискатель Воронина Яна Алексеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

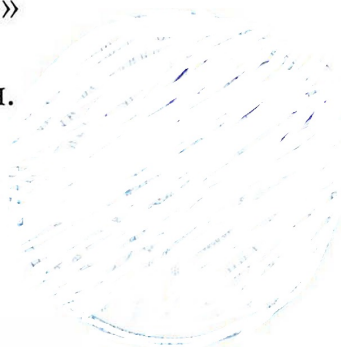
10 декабря 2024 г.

П.В. Авдонин

«Подпись П.В. Авдонина заверяю»

Учёный секретарь ИБР РАН, к.б.н.

Хабарова М.Ю.



Контактные данные:

ФИО: АВДОНИН Павел Владимирович

Должность, звание: доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией.

Место работы и адрес работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, лаборатория Физиологии рецепторов и сигнальных систем, 119334, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 26. ИБР РАН

Телефон рабочий: 797022-1234

Адрес эл почты рабочей: 797022@ibbr.ru