

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Биличенко Андрея Сергеевича «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», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.5 - Физиология человека и животных

Актуальность темы

Диссертационная работа А.С. Биличенко посвящена одной из важнейших проблем в наиболее значимом для фундаментальной и клинической кардиологии направлении, связанном с изучением физиологических механизмов механоэлектрической обратной связи и возможности ее регуляции в сердце. Наличие механоэлектрической обратной связи в сердце как явления, противоположного электромеханическому сопряжению, постулировано достаточно давно, и строго доказано более 20 лет назад. В основе механоэлектрической обратной связи лежит работа выявленных примерно в то же время механоуправляемых каналов, которые, в ответ на растяжение кардиомиоцитов, формируют суммарный входящий катион-неселективный ток, лежащий в основе изменений в форме потенциалов действия. Эти изменения обычно наблюдаются на фоне реполяризации потенциалов действия в виде механоиндуцированной деполяризации, которая в норме, а особенно при патологии сердца (например, гипертрофии) приводит к возникновению экстра-потенциалов действия, т.е. аритмии. Поэтому основной вопрос, который стоит в настоящее время, связан с необходимостью изучения возможности регуляции работы механоуправляемых каналов, что имеет не только принципиальное значение для понимания фундаментальных механизмов регуляции работы сердца, но и существенное значение для прикладных, клинических аспектов этой проблемы, в плане создания новых фармакологических препаратов.

Этим, совершенно не изученным ранее вопросам регуляции работы механоправляемых каналов сердца, посвящено диссертационное исследование А.С. Биличенко, которое базировалось на более ранних работах, выполненных под руководством профессора А.Г. Камкина, где было показано, что оксид азота (NO) необходим для активации механоправляемых каналов, а в его отсутствии эти каналы не реагируют на растяжение клеток.

Работа А.С. Биличенко посвящена изучению путей воздействия NO на функционирование активируемых растяжением ионных каналов кардиомиоцитов желудочков сердца крыс, а именно, прямого и/или опосредованного растворимой гуанилатциклазой воздействия на эти каналы. Хотя вопросы регуляции работы потенциалуправляемых каналов посредством путей NO-гуанилатциклазного механизма в определенной степени изучены, вопросы регуляции по этому пути механоправляемых каналов являются до сих пор «белым пятном» в науке. Решение этих актуальных для современной физиологии и медицины вопросов и взял на себя автор диссертационной работы.

Научная новизна исследования

В работе впервые проведен систематический активаторно-ингибиторный анализ путей воздействия оксида азота на механочувствительные токи в кардиомиоцитах крыс. С помощью прямой активации растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) кардиомиоцитов соединением ВАУ 41-2272 и широкого использования других соединений, влияющих на активность растворимой гуанилатциклазы и цГМФ-зависимой протеинкиназы, а также на процессы S-нитрозилирования белков, стало возможным сопоставить прямой и опосредованный pГЦ вклад NO в регуляцию механочувствительных токов в сердце. Существенный интерес и новизну представляют данные, полученные автором о транскриптах генов механоправляемых каналов, обнаруженных в изолированных

кардиомиоцитах крыс. Эти результаты открывают возможность молекулярно-генетических исследований регуляции механочувствительных каналов в сердце оксидом азота. Таким образом, научная новизна полученных А.С. Биличенко данных не вызывает сомнений.

Достоверность полученных данных

Диссертационная работа выполнена на изолированных кардиомиоцитах желудочков крыс широко применяемым в настоящее время методом patch-clamp в конфигурации whole cell. В работе представлены данные, полученные в результате полного выполнения экспериментального протокола на 188 клетках, полученных от 49 животных. Этого более чем достаточно для исследований, проводимых методом patch-clamp. Полученные данные были статистически обработаны с помощью известного пакета программ *Molecular Devices Axon pClamp 10.2*, и значимые различия были обнаружены с помощью однофакторного дисперсионного анализа для повторных измерений (ANOVA for RM) с тестом Хольма-Сидака в качестве post-hoc теста. Нормальность распределения выборок в работе проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилкса. Следует отметить, что контрольные регистрации ионных токов кардиомиоцитов, полученные автором, совпадают с таковыми, представленными в литературе для кардиомиоцитов желудочков крыс. Достоверность полученных в исследовании результатов не вызывает сомнений.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Сформулированные в диссертационной работе научные положения и выводы основываются на большом количестве экспериментальных данных, которые были получены с помощью адекватной методики и корректной

статистической обработки результатов (см. выше). Основные результаты и теоретические положения диссертационного исследования были опубликованы в ведущих международных и отечественных рецензируемых журналах (4 публикации в журналах J Physiol Biochem, 2019; Bull Exp Biol Med, 2019; Physiol Rep, 2022; Bull Exp Biol Med, 2023) и неоднократно обсуждены на конференциях, включая XXIV Съезд Физиологов (Санкт-Петербург, 2023). Кроме того, экспериментальные подходы, изложенные в диссертации, результаты и выводы прошли научную экспертизу и получили положительную оценку Российского научного фонда (Проект № 16-14-10372 «Механизм действия NO, как первого обнаруженного регулятора механоуправляемых каналов» на 2016-2018 годы) и Минздрава России (Государственное задание № АААА-А18-118051590121-0 «Разработка инновационного подхода, основанного на изучении связи генетических факторов, определяющих фенотип механоуправляемых ионных каналов клеток сердца, с риском развития аритмий и внезапной сердечной смерти на фоне ишемической болезни сердца и разработка алгоритма ранней диагностики и лечения нарушений ритма сердца» на 2018-2020 годы и Государственное задание № 121052800049-0 «Регуляция механизмов активации и инактивации механоуправляемых ионных каналов, играющих ключевую роль в возникновении аритмий и фибрилляции» на 2021-2023 годы). В связи с вышеизложенным научные положения и выводы диссертации А.С. Биличенко представляются достоверными и обоснованными.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 25 рисунков и 18 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 284 источника. Диссертация написана по стандартному образцу и состоит из традиционных разделов, таких как «Оглавление», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»,

«Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Материалы, представленные в каждом из разделов, полностью соответствуют необходимому описанию.

Актуальность исследуемой проблемы, степень её разработанности, цель и задачи исследования, научно-практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту, отражены в разделе «Введение». Этот раздел также содержит информацию о личном вкладе автора в работу. Выводы диссертации полностью соответствуют задачам, сформулированным в разделе «Введение».

Обзор литературы по теме диссертации чётко структурирован, снабжен иллюстрациями, написан в хорошем научном стиле. На основе современной литературы диссертант излагает современные представления по изучаемым вопросам.

Глава «Материалы и методы» включает детальное описание всех методических вопросов. В целом, используемые подходы и методы являются адекватными для успешного решения поставленных в диссертации задач.

Глава «Результаты и обсуждение» включает в себя описание большого объема экспериментальных данных и состоит из разделов (каждый раздел соответствует определенной экспериментальной серии), в каждом из которых автор подробно описывает результаты экспериментов, приводя соответствующие графики и таблицы. Как положительный момент следует отметить, что после каждого раздела с описанием экспериментальных серий одного направления автор приводит раздел с детальным обсуждением полученных результатов с привлечением актуальных литературных данных.

В разделе «Заключение» автор обобщает основные результаты работы и показывает значение оксида азота NO в регуляции токов через механоуправляемые каналы и в формировании механоэлектрической обратной связи, занимающей одно из ключевых мест в регуляции деятельности сердца в целом.

Представленные выводы, вытекающие из полученных экспериментальных данных, соответствуют поставленным задачам исследования.

В целом, представленная диссертационная работа не вызывает серьёзных замечаний, однако поднимает ряд вопросов дискуссионного характера.

1. Как сообщает автор, ингибитор sGC ODQ в отсутствие растяжения клеток уменьшал I_{SAC} , а последующее введение NO его увеличивало. На фоне растяжения клеток ODQ полностью устранял I_{SAC} , вызванный растяжением клетки, но дополнительное введение NO его вновь увеличивало. На основании этого автор полагает, что помимо пути NO-sGC-cGMP, может быть и прямое влияние NO на механоуправляемые каналы.

Действительно, ODQ рассматривается в литературе как эффективный блокатор sGC, и на этом основании автор его использует. Но, как отмечает сам же автор, ODQ в результате его метаболического преобразования ферментной системой цитохрома P-450 превращается в ингибитор NOS. Однако, если ODQ блокирует не только sGC, но и NOS, как пишет автор, то его действие имеет двойной характер с позиций данных, представленных в литературе. С одной стороны – это блокада NO-sGC-cGMP сигнального пути. С другой стороны, это устранение I_{SAC} благодаря блокаде NOS, что, согласно литературным данным, приводимым автором в обзоре литературы, показано при применении ловушки NO – PTIO, блокатора NOS – L-NAME или LNMA, применение которых полностью устраняло или предотвращало появление I_{SAC} , а также при использовании NOS^{3-/-} мышей, у которых нельзя было получить I_{SAC} . В связи с этим в дальнейших работах в этом направлении, автору целесообразно использовать другой блокатор sGC, либо продемонстрировать, что за время эксперимента ODQ существенно не изменяет активность NOS.

2. Сходная ситуация касается ингибирования S-нитрозилирования. В литературе представлены ингибиторы S-нитрозилирования дитиотреитол и аскорбиновая кислота, при этом автор выбрал аскорбиновую кислоту, которая более специфично, чем дитиотреитол, ингибирует S-нитрозилирование и мало влияет на формирование дисульфидных связей. Автор показал, что аскорбиновая кислота полностью устраняет I_{SAC} , вызванный растяжением

кардиомиоцита, а дополнительно введенный в среду донор NO не влияет на ток. Автор полагает, что устранение I_{SAC} и отсутствие эффекта донора NO связано с блокадой S-нитрозилирования. Вместе с тем необходимо учитывать, что аскорбиновая кислота является классическим антиоксидантом и может оказывать плеiotропное действие в клетке, что следовало бы обсудить и учитывать в дальнейших исследованиях.

3. с. 114. Какая роль, по мнению диссертанта / по данным литературы, может отводиться цГМФ в кардиомиоцитах помимо активации PKG?

4. На мой взгляд, первая часть вывода 6 о двойственной роли NO в регуляции механозависимых токов кардиомиоцитов крысы не настолько экспериментально обоснована в данной работе, чтобы быть вынесенной в выводы. Кроме этого, по смыслу она не сочетается со второй частью вывода 6 об экспрессии в кардиомиоцитах генов белков механоправляемых каналов.

В плане оформления диссертационной работы имеются следующие замечания.

1. В тексте нередко встречаются опечатки, например, на сс. 4, 14, 17, 34, 40, 43 и др.

2. Автор часто использует английские термины при наличии русскоязычных эквивалентов, например, cross talk, time course, online, L-Arginine, peroxynitrite и др., а также иногда англицизмы типа «реверсibelный».

Наряду с принятым в русскоязычной научной литературе термином АФК (активные формы кислорода) используются аббревиатуры ROS и ROX.

Встречаются даже «гибридные предложения»: Физиологическое растяжение быстро активирует восстановленную форму (reduced-form) nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2 (NOX2) с образованием reactive oxygen species (ROS) (Prosser et al., 2011).

3. Материалы и методы. 2.8 Секвенирование и анализ РНК. Почему после QC секвенированные данные выравнивали по отношению к эталонному геному человека, ведь исследовали крыс?

4. Подпись к Рис. 8Б. В этом эксперименте не использовали ВАУ 41-2272, который указан в подписи.
5. Опечатка в Табл. 7: -179 ± 0.02 вместо -0.179 ± 0.02
6. Неудачная формулировка в выводе 2: «Стимулятор NO-независимого места связывания растворимой гуанилатциклазы.....». Более правильно было бы - прямой активатор растворимой гуанилатциклазы.

Заключение

Указанные замечания не имеют принципиального значения и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация А.С. Биличенко, несомненно, является оригинальным научным исследованием, выполненным лично автором. В результате проведенных исследований автором получены новые данные фундаментального характера о механизмах регуляции оксидом азота механочувствительных ионных каналов в кардиомиоцитах крыс, которые также имеют прикладное значение в плане разработки перспективных кардиотропных лекарственных препаратов.

По актуальности, научной и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует 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, Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

