

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Нагаевой Элины Ильдаровны «Поиск и изучение лигандов протон-активируемых ионных каналов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Диссертационная работа Нагаевой Э.И. выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, известной своими традициями и успехами в области электрофизиологических исследований. Объектом исследования являются протон-активируемые ионные каналы млекопитающих, достаточно давно известные рецепторы, всплеск изучения которых начался после получения пространственной структуры рекомбинантного аналога куриного ASIC1a, в том числе с несколькими лигандами. Сегодня общепризнанна значимая роль ASICs в различных физиологических процессах в том числе патологических, из-за чего работы по изучению механизма функционирования канала, кинетики его взаимодействия с различными лигандами, конкуренция таких лигандов с протонами или поиск новых модуляторов канала носят не только фундаментальный характер, но и преследуют практические цели по разработке лекарств нового поколения с направленным действием.

Перед диссертантом были поставлены 4 задачи, требующие, как проведение экспериментальной работы, так и аналитической проработки полученных результатов. Для экспериментальной работы использовался только метод локальной фиксации потенциала для измерения тока через поверхность целой клетки. В качестве объектов измерения были выбраны клетки СНО, которые экспрессировали различные каналы ASIC после временной трансфекции плазмидой, кодирующей канал. В качестве контроля трансфекции, дополнительно трансфецировали клетки плазмидой с GFP, но на мой взгляд более правильным решением было бы использование единой плазмиды, экспрессирующей оба продукта. Впрочем, эти технические моменты не следует считать недостатком работы, так как в каждом научном коллективе есть свои методические наработки, проверенные опытным путем.

Электрофизиологические методы являются самыми наглядными и наиболее достоверными для характеристики ионотропных рецепторов, поэтому выполненную Нагаевой Э.И. работу следует отнести к числу передовых научных исследований. Это же относится и к методике культивирования линии клеток. Очень повезло диссертанту с объектами исследования, а именно то, что Элина была обеспечена большим количеством аналогов активных лигандов, которые для нее синтезировались некими коллегами, о

которых в работе было скромно умолчено. Но я бы отметил их ценный вклад в работу.

Достаточно большой пул аналогов был изучен, что позволило проанализировать элементы структуры гидрофобных моноаминов. Впоследствии это переросло в последнюю задачу по предсказанию и анализу возможных эндогенных лигандов для ASIC. Именно обнаружение эндогенного лиганда - гистамина, который по полученным экспериментальным данным осуществляет параллельный сдвиг активационной кривой в более щелочную область, следует считать самым ярким открытием. В литературе многократно высказывалось предположение, что ASIC каналы являются рецепторами не только на протоны, но и на некоторые другие соединения, но такие эндогенные лиганды до сих пор опубликованы не были. К сожалению, гистамин самостоятельно не вызывает открытия каналов как истинный агонист, однако его потенцирующий эффект является важным экспериментальным фактом, который необходимо учитывать всем исследователям.

Диссертация сформирована из стандартных разделов: Обзор литературы, Материалы и методы исследования, Результаты и обсуждения. Заканчивается работа достаточно объемным разделом Заключение, где автор суммирует наиболее значимые результаты работы, но при этом почти дословно повторяет многие тезисы, ранее написанные ей в обсуждении результатов, и разделом Выводы. Список сокращений автор приводит сразу за титульным листом, что делает очень удобным чтение ее работы. Для меня странным было только одно использованное сокращение EC_{50} , обычно обозначающее полумаксимальную эффективную концентрацию, в диссертации это концентрация лиганда, вызывающая 50% потенцирования.

Диссертация имеет объем 124 машинописных страниц, наиболее важные два раздела: Обзор литературы занимает 48 страниц; и раздел Результаты и обсуждения занимает 38 страниц. Список цитированной литературы более чем достаточен - 193 статьи в научных журналах, среди них работы, опубликованные в 2014 и 2015 годах. Работа хорошо иллюстрирована 8 рисунками в Обзоре литературы и 18 в Результаты. Изложение работы понятное, но есть небольшие претензии к оформлению, встречаются опечатки и опечатки, автор использует профессиональные жаргонизмы. Далее хотелось бы изложить свои замечания по разделам.

Литературный обзор, подробный, понятный, как уже упомянуто было выше неплохо иллюстрированный, он дает неплохое понимание о структурных особенностях рецепторов, их локализации в тканях и вовлеченности в основные процессы жизнедеятельности. К замечаниям здесь можно отнести отсутствие размерности времени в таблице 1.1, из-за чего неясно как быстро каналы могут десенситизироваться, и неправильное сокращение

НПВС на рисунке 1.7. Не знаю, стоит ли считать удачным использование русских названий в трехбуквенном обозначении аминокислотных остатков, но как минимум на рисунке 1.3 правильные английские обозначения стоило бы перевести тоже. На рисунке 1.7 показаны сайты взаимодействия различных ингибиторов крысиных/человечьих ASIC1a и ASIC3 на модели куриного ASIC1a, было бы интересно знать насколько гомологична первичная структура этих каналов в этих местах связывания с лигандами.

Относительно списка лигандов, изложенных в обзоре литературы, и с учетом тематики работы, существенным упущением следует считать пропуск информации о взаимодействии одного из главных нейромедиаторов - серотонина с ASIC3 в исследованиях *in vitro* и *in vivo* (Wang, X. и др. (2013) *J. Neurosci*, 33, 4265–4279.). Возможно, интересным было бы включение еще нескольких работ по необычным лигандам ASIC (Dubinnyi, M.A. и др. (2012) *J. Biol. Chem.* 287, 32993–33000, Kozlov, S.A. и др. (2012) *Russ. J. Bioorganic Chem.* 38, 578–583, Osmakov, и др. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 23116–23127.).

Раздел Материалы и методы исследования поражает читателя своим скромным размером (порядка 90% информации этого раздела приведено в автореферате). Раздел описывает, как проводилась клеточная работа, как собирались данные электрофизиологических измерений, как данные обрабатывали и состав основных растворов. Для работы не менее важна информация: как были устроены плазмиды, экспрессировавшие GFP и гомомерные ASIC, были ли использованы индукторы для инициации экспрессии, конкретно субъединицы каких видов животных или человека экспрессировали (наиболее вероятные кандидаты рецепторы крысы или человека). На странице 67 работы описывается сравнение действия соединений на нативные и рекомбинантные каналы. Материалы и методы не раскрывают, как работа на нативных каналах была проведена.

Результаты также не лишены некоторых недоработок.

В разделе 3.1.1 при изучении действия гидрофобных аминов на ASIC1a было показано, что одно вещество неактивно, одно обладает хорошим ингибирующим эффектом и два амина - менее выраженные ингибиторы. На мой взгляд, в случае мемантина, который явно проявлял концентрационно-зависимое действие, можно было бы построить концентрационную зависимость действия, если бы автор перешел ту условную границу в 1 мМ, поставленную из соображений отсечения малоактивных компонентов. В этом случае помимо расчета IC_{50} можно было бы показать, способен ли мемантин полностью ингибировать ток через ASIC1a или его действие приводит к неполной блокаде канала.

В разделе 3.1.3. где приводится сравнение действия соединений на нативные и рекомбинантные ASIC автор пишет, что в ЦНС позвоночных можно встретить ASIC1a-гомомерные, а также ASIC1a/2a и ASIC1a/2b гетеромерные каналы. Далее идет анализ только по предполагаемому действию на нативные гетеромерные каналы ASIC1a/2a. Про вклад субъединицы ASIC2b никаких предположений не выдвигается.

При изучении влияния на ASIC3 использовали активацию закислением до pH 6.85. Известно, что различная степень закисления раствора приводит к изменению соотношения стационарной и пиковой компоненты ответа у этого канала. Интересно узнать, были ли сделаны предварительные эксперименты с вариациями степени закисления. Также на рисунке 3.6 на различных панелях контрольные токи не совсем похожи между собой именно по степени соотношения пиковой и стационарной компоненты ответа.

В подписи к рисункам 3.8 и 3.18 упоминается действие на пиковый компонент гомомерных ASIC1a, с научной точки зрения это не верно, так как обычно ответ ASIC1a на закисление считается однокомпонентным. На самом рисунке приведены данные в виде гистограммы со стандартными отклонениями, но уровень достоверности результатов на рисунке не указан, поэтому насколько хорошо одни значения отстоят от других читателю приходится рассчитывать самостоятельно. На рисунках 3.10 и 3.11 также упущено это обозначение.

При исследовании зависимости от pH на рисунках 3.14 и 3.15 приведено только по два эксперимента, рекомендовано для понятия общей тенденции использовать 3-4 различных значений pH. Эффект, отображенный на рисунке 3.15б, получен при активации pH 4.0 в тексте написано pH 5.0.

На странице 100 автор пишет «Стоит сказать, что возможность быть активированными лигандами, отличными от протонов, на данный момент описана только для ASIC3 каналов. GMQ и амилорид способны активировать эти каналы в нейтральной среде, приблизительно с той же эффективностью, что и ИЭМ-2117, вызывая стационарный входящий ток (Li et al., 2011; Yu et al., 2011).» При этом упущена работа 23 в списке литературы, которая рассказывает об активирующем действии миттоксинов на различные типы ASIC.

Высказанные замечания и вопросы не снижают моей высокой оценки работы, которая демонстрирует профессионализм автора. Результаты работы можно характеризовать как значимые, они, безусловно, имеют большое научное и практическое значение, как для биохимии и физиологии, так и для фармацевтики. Надеюсь, что автор продолжит изучение этих интересных объектов после защиты диссертации.

По теме диссертации опубликованы 2 статьи в рецензируемых журналах, где представлены все материалы, вынесенные на защиту. Автореферат соответствует содержанию диссертации и адекватно отражает все разделы работы. Выводы отражают экспериментальный материал и являются обоснованными, кроме последнего пятого, который, на мой взгляд, относится к области предположений и никак не подкреплен экспериментальными данными.

Заключение.

Диссертация Нагаевой Элины Ильдаровны «Поиск и изучение лигандов протон-активируемых ионных каналов» является законченной научно-исследовательской работой отличного уровня, в которой всесторонне изучены свойства гидрофобных моноаминов на протон-активируемых ионных каналах. Совокупность полученных результатов можно рассматривать как научное достижение в области биохимии и физиологии. Таким образом, по актуальности темы, обоснованности выводов, достоверности и новизне результатов, их научной и практической значимости работа Нагаевой Э.И. отвечает требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

Заведующий лаб. нейрорецепторов и
нейрорегуляторов Учреждения
Российской академии наук
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН
доктор химических наук

Подпись Козлова С.А. заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН
доктор физ.-мат. наук



17.11.2015
С.А. Козлов

Олейников В.А.