

ОТЗЫВ

официального оппонента

кандидата биологических наук Карпушева Алексея Валерьевича на диссертационную работу **Томилина Виктора Николаевича «Кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах человека: идентификация и механизмы регуляции»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность темы.

Диссертационная работа Томилина В.Н. посвящена идентификации и исследованию механизмов регуляции кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6, относящихся к большому суперсемейству ионных каналов TRP (transient receptor potential), в клетках лимфобластной лейкемии Jurkat и в нормальных лимфоцитах, выделенных из периферической крови человека.

Актуальность данной работы определяется тем, что внутриклеточный Ca^{2+} является одним из важнейших регуляторов многих физиологических и патологических процессов, происходящих в клетках крови, включая дегрануляцию и пролиферацию клеток, продукцию цитокинов, регуляцию белков цитоскелета, активацию клеточных киназ и фосфатаз, транскрипционный контроль и модуляцию поверхностных рецепторов. До сих пор принято считать, что основной вклад в поступление ионов Ca^{2+} в клетки крови вносят кальциевые каналы, активируемые опустошением внутриклеточных кальциевых депо. Однако, каналы суперсемейства TRP также принимают участие во входе Ca^{2+} в клетку, но их роль в жизнедеятельности лимфоцитов остается слабо изученной.

Структура и объем диссертации.

Структура диссертации соответствует общепринятому плану и включает в себя введение, обзор литературы, описание методов исследования, результаты собственных экспериментов, обсуждение полученных результатов. В конце диссертации приведено общее заключение, выводы и список использованной литературы. Диссертационная работа изложена на 104 страницах машинописного текста, иллюстрирована 35 рисунками. Библиография включает 187 источников.

Представленный обзор литературы подчеркивает актуальность изучаемой проблемы. В нем дается общая характеристика роли ионов Ca^{2+} в активации лимфоцитов и описание кальциевых каналов, ответственных за вход Ca^{2+} в лимфоцитах. Особое внимание уделено рассмотрению каналов суперсемейства TRP. В целом литературный обзор диссертационной работы свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния исследований в данной области, что позволило логически обосновать цели и

задачи исследования.

В главе материалы и методы исследования дается подробное описание методических приемов, позволивших идентифицировать кальциевые ионные каналы и исследовать механизмы их регуляции, изучить их экспрессию и структурные особенности. Работа выполнена на высоком методическом уровне. В проведенном исследовании автор продемонстрировал квалифицированное владение современными высокотехнологичными экспериментальными методами: метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурациях whole-cell и outside-out, иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. Применяемые методики адекватны поставленным задачам исследования, объем проведенных экспериментов достаточен для получения статистически достоверных результатов. Полученные автором экспериментальные данные хорошо документированы. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Степень научной новизны результатов и основных положений диссертации, выносимых на защиту.

Представленные результаты исследования, без сомнения, имеют научную новизну и важны для понимания как прикладных, так и фундаментальных вопросов кальциевой сигнализации. В проведенной научно-исследовательской работе впервые были зарегистрированы и идентифицированы кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в нормальных лимфоцитах человека и в клетках линии Jurkat. С помощью метода иммунофлуоресценции была подтверждена экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и лимфоцитах человека. Показано, что каналы TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat способны образовывать как гомо- так и гетеротетрамеры. Впервые произведено сравнение характеристик и экспрессии кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и нормальных лимфоцитах периферической крови человека. Выявлен повышенный уровень активности каналов и экспрессии TRPV6 в клетках Jurkat по сравнению с нормальными лимфоцитами, что говорит о потенциальной роли этих каналов в злокачественной трансформации лимфоцитов. Показано, что внеклеточный pH воздействует на активность каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat. Впервые, показана колокализация каналов TRPV5 и TRPV6 с клатрином а также с белком, маркером раннего эндоцитоза - EEA1. Впервые получены результаты позволяющие сделать вывод о регулирующей роли эндоцитоза в активности кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 в плазматической мембране клеток Jurkat. Полученные данные существенны для понимания роли каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных и патологических процессах в лимфоцитах человека. Фундаментальное значение имеет анализ взаимосвязей эндоцитоза и канальных белков, как ключевого звена в контроле уровня внутриклеточного кальция клеток крови.

Экспериментальные данные обсуждены автором с привлечением современной литературы. Научные положения и выводы полностью вытекают из результатов собственных экспериментов, соответствуют поставленным задачам и хорошо согласуются с результатами, полученными другими исследователями.

Материалы диссертации достаточно полно отражены в восьми печатных работах, включая две статьи, опубликованные в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях, и шесть тезисов докладов. Материалы научной работы доложены и обсуждены на двух российских и двух международных конференциях. Автореферат диссертации соответствует требованиям ВАК РФ и полностью отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний к работе нет.

Заключение.

По актуальности, новизне и объему проведенных исследований диссертация Виктора Николаевича Томилина «Кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах человека: идентификация и механизмы регуляции» является научной квалифицированной работой и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а автор заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Старший научный сотрудник
Группы Клеточной Биологии
Института Молекулярной Биологии и Генетики
Северо-Западного федерального медицинского исследовательского центра,
Минздрава России,
К.б.н.

Кар

/Карпушев А.В./

Адрес: 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д.2
Тел: +7 (812) 702-37-06
E.mail: akarpushev@yandex.ru

