

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию **Томилина Виктора Николаевича** на тему: «**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

Ca^{2+} является универсальным вторичным мессенджером, действующим в клетках бактерий, растений и животных. Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, секреция, сокращение, передача нервного импульса, иммунный ответ и т.д. В клетках иммунной системы, таких как лимфоциты, тучные клетки, макрофаги, ионы Ca^{2+} работают на всех стадиях жизни клетки, включая развитие, активацию, дифференцировку, продукцию цитокинов и, наконец, смерть клетки. В поддержании Ca^{2+} гомеостаза и в запуске различных клеточных процессов в клетках крови ведущую роль играют каналы входа Ca^{2+} плазмалеммы. Репертуар Ca^{2+} -проводящих каналов в мембране лимфоцитов и других клеток иммунной системы чрезвычайно широк. В то же время, тонкие механизмы активации и регуляции этих каналов, а также функциональная роль Ca^{2+} -каналов в жизнедеятельности клеток крови далеки от полного понимания.

В лаборатории Ионных механизмов клеточной сигнализации Института Цитологии РАН были впервые идентифицированы Ca^{2+} -каналы TRPV5 и TRPV6 в клетках K562 миелоидной лейкемии человека. Показано блокирование этих каналов внеклеточным Ca^{2+} и рутениевым красным.

Диссертация **В.Н. Томилина**, посвященная молекулярной идентификации и исследованию биофизических характеристик и механизмов регуляции кальциевых каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных и трансформированных лимфоцитах

человека, является логическим продолжением и развитием этих исследований и несомненно является **актуальной**.

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану: включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты экспериментов и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 187 публикаций. Диссертация написана четко и логично. Несколько затрудняет прочтение диссертации цитирование работ “по номерам” в списке литературы.

Актуальность работы диссертант объективно обосновал во введении. Там же четко сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

В разделе “Обзор литературы” проведен анализ самых последних данных литературы о структурно-функциональной организации, биофизических характеристиках, фармакологическом профиле и механизмах регуляции каналов суперсемейства TRP, играющих важную роль в гомеостазе кальция и других ионов в организме. Особый интерес имеет раздел 2.4, в котором описаны данные о роли кальциевых каналов TRPV6 в канцерогенезе различных тканей. Подробно изложены роль этих каналов в развитии заболевания и степень корреляции экспрессии каналов с прогрессированием болезни. Весьма информативным является подраздел 2.3.3, в котором описаны данные об участии каналов подсемейства TRPML в процессах, связанных с везикулярным транспортом. Детально описана роль TRPML каналов в поддержании внутривезикулярного гомеостаза и заболеваниях, связанных с мутациями этих каналов. Возможно, в конце обзора литературы целесообразно было бы ввести общее заключение и еще раз сформулировать цель и задачи работы. В целом, обзор оставляет приятное впечатление. Изложение материала проведено на высоком теоретическом уровне и свидетельствует о широкой эрудиции автора.

Важность и достоверность получаемых результатов в любой экспериментальной работе зависит, прежде всего, от адекватности и корректности

применения методических подходов. Работа В.Н. Томилина выполнена на высоком методическом уровне, с использованием метода локальной фиксации потенциала на мембране - пэтч-клэмп (patch-clamp method) в различных конфигурациях. Очень ценно, что биофизическое исследование активности каналов дополнено иммунофлуоресцентными исследованиями. В разделе "Материалы и методы" описаны автоматизированная установка, конфигурации метода пэтч-клэмп, особенности иммунофлуоресцентного метода, объекты исследования, используемые растворы, методы обработки полученных данных.

Полученные В.Н. Томилиным экспериментальные данные (раздел 4) несомненно являются **новыми**. С использованием метода пэтч-клэмп и иммунофлуоресцентного окрашивания **впервые** идентифицированы кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в клетках лимфоидной лейкемии линии Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека. Исследованы механизмы регуляции активности TRPV5 и TRPV6 каналов в клетках Jurkat.

Впервые проведено детальное исследование биофизических характеристик и фармакологического профиля кальциевых каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека. Показано, что биофизические характеристики кальциевых каналов в нормальных и злокачественно трансформированных лимфоцитах практически идентичны. В то же время, плотность TRPV5/V6 каналов выше в мембране клеток Jurkat по сравнению с нормальными лимфоцитами.

Особое внимание в работе уделено изучению механизмов регуляции идентифицированных каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках крови. В этой связи, особую новизну и значимость имеют экспериментальные разделы 4.2.1 и 4.2.2 диссертации, в которых представлены данные о воздействии внеклеточного pH и ингибитора динамина (участника клатрин-зависимого эндоцитоза) дайнасора на активность каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat. С использованием метода пэтч-клэмп показано, что активность TRPV5/V6С каналов модулируется внеклеточным pH. При щелочных значениях pH наблюдается увеличение активности каналов, в

то время как при кислых значениях pH происходит блокирование активности каналов. Обнаружено также, что добавление дайназора к мембранным фрагментам outside-out приводит к ингибированию активности кальциевых каналов в клетках Jurkat.

С использованием методов иммунофлуоресценции на клетках Jurkat получены красивые данные о колокализации TRPV5 и TRPV6 каналов с клатрином и маркером ранних эндосом EEA1. Совокупность полученных данных позволяет автору сделать важный вывод о том, что в регуляции активности TRPV5 и TRPV6 каналов в лимфоцитах может участвовать клатрин/динамин – зависимый эндоцитоз.

Пятый раздел диссертационной работы посвящен общему обсуждению полученных результатов. Автор критически и на высоком теоретическом уровне анализирует собственные экспериментальные данные и сопоставляет их с данными литературы.

Необходимо отметить, что работа хорошо написана и оформлена, в ней приведены многочисленные (35) информативные рисунки, дающие возможность детально ознакомиться как с исходным экспериментальным материалом, там и с результатами его обработки. Работа хорошо построена по логике экспериментов и по логике изложения материала.

Выводы сформулированы автором четко и обоснованно.

При прочтении диссертации возникли следующие вопросы и замечания:

1. Имеются некоторые незначительные замечания по оформлению диссертации. Так, в тексте работы встречаются опечатки (стр. 5, 15, 60) и неудачные выражения ('интегральная активность моновалентных токов', стр. 2; "моновалентные токи", стр. 60; 'деполяризация мембраны каналами TRP', стр. 49). В работе отсутствуют ссылки на авторов некоторых рисунков (рис. 2-10, 12).
2. В диссертации исследована чувствительность кальциевых каналов в лимфоцитах к блокирующему действию рутениевого красного. Что

известно о влиянии на активность TRPV5 и TRPV6 каналов в клетках иммунной системы других фармакологических агентов (активаторов, ингибиторов или модуляторов)?

3. В диссертации изучалось влияние растворов с различными значениями pH на активность кальциевых каналов. Почему в работе используются растворы именно с такими значениями pH: 6,0; 7,3; 8,2? Что известно о влиянии pH на другие типы ионных каналов?
4. Насколько универсально участие везикулярного транспорта в регуляции активности ионных каналов?
5. Что известно об экспрессии и роли потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов Cav1 в функционировании лимфоцитов и других клеток крови?

Несмотря на замечания и возникшие вопросы представленная работа несомненно является целостным и актуальным исследованием. Диссертация В.Н. Томилина выполнена на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки, в ходе ее выполнения получены новые данные по актуальной проблеме. Являясь законченным исследованием, работа при этом раскрывает большие перспективы для дальнейшего развития.

Диссертация В.Н. Томилина имеет несомненное теоретическое и практическое значение для цитологии, клеточной биологии, биофизики, физиологии, медицины. Полученные автором новые данные об экспрессии и механизмах регуляции кальциевых каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека вносят существенный вклад в понимание механизмов активации и регуляции ионных каналов, а также в выяснение механизмов внутриклеточной сигнализации в целом.

Основные результаты и выводы диссертации отражены в 8 публикациях в ведущих отечественных и зарубежных изданиях и автореферате; их можно рекомендовать для использования в работе биологических факультетов ряда университетов, физиологических и медицинских институтов, в частности в Санкт-Петербургском государственном университете, Санкт-Петербургском

государственном техническом университете, Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, Институте Эволюционной Физиологии и Биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Институте Физиологии им. И.П. Павлова РАН, Институте Цитологии РАН, Институте Биофизики клетки РАН, Институте Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, а также в учебном процессе соответствующих вузов.

Заключение: по актуальности, новизне и объему проведенных исследований диссертация **Виктора Николаевича Томила** «Кальциевые каналы TRPV5 и TRPV6 в лимфоцитах человека: идентификация и механизмы регуляции» является научной квалификационной 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 В.Н. Томилин заслуживает присвоения искомой степени по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Зав. кафедрой биофизики

Биологического факультета

Санкт-Петербургского государственного университета

профессор, доктор биологических наук

З.И. Крутецкая

9.02.2015г.

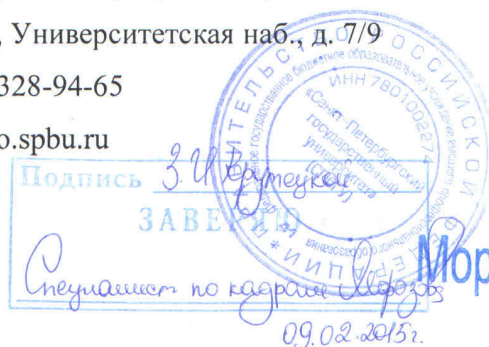
З.И.

Крутецкая Зоя Ириарховна – профессор, зав. кафедрой биофизики СПбГУ

Адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

Тел.: + 7 (812) 328-94-65

E.mail: zk@bio.spbu.ru



Морозова С.Г.