

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА  
Д 002.230.01 НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ПО ДИССЕРТАЦИИ **ТОМИЛИНА ВИКТОРА НИКОЛАЕВИЧА**  
НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 27 февраля 2015 № 194/373

О присуждении **ТОМИЛИНУ ВИКТОРУ НИКОЛАЕВИЧУ** (Россия)  
учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация **«КАЛЬЦИЕВЫЕ КАНАЛЫ TRPV5 И TRPV6 В  
ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМЫ  
РЕГУЛЯЦИИ»**

**по специальности 03.03.04 – клеточная биология, гистология, цитология**

**принята к защите 12.12.2014 г., протокол № 189/368** Диссертационным советом Д 002.230.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий проспект, д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утверждён приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

**Соискатель** Томилин Виктор Николаевич, 1988 года рождения, в 2011 г. окончил кафедру биофизики, физико-механического факультета Санкт-Петербургского государственного политехнического университета с присвоением степени магистра физики. С 06.10.2011 - по 05.10.2014 гг –

очная аспирантура в Лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации Института цитологии РАН. Диссертация выполнена в порядке прохождения очной аспирантуры.

**Работает** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2011 года в Лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации, с 07.10.2014 года по настоящее время – младший научный сотрудник.

**Диссертация выполнена** в Лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

**Научный руководитель** – кандидат биологических наук, **СЕМЕНОВА СВЕТЛАНА БОРИСОВНА**, старший научный сотрудник Лаборатории ионных механизмов клеточной сигнализации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

Официальный оппоненты:

1. **КРУТЕЦКАЯ ЗОЯ ИРИНАРХОВНА**, доктор биологических наук, профессор, заведующая Кафедрой биофизики, Биологического факультета, Санкт-Петербургского государственного университета.
  2. **КАРПУШЕВ АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, федерального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова, Минздрава здравоохранения Российской Федерации.
- дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург в своём положительном

отзыве, (составлен заведующим Лабораторией возбудимых мембран ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург), доктором биологических наук, профессором Б.В. Крыловым и утвержден директором ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург), член-корреспондентом РАН, доктором медицинских наук, профессором, Д.П. Дворецким) указала, что диссертационная работа выполнена на высоком научно-методическом уровне, результаты представляют научно-практическую ценность и соискатель заслуживает присуждения искомой степени, и

- дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 8 публикаций, из них 2 работы опубликованы в рецензируемых научных изданиях, в том числе 2 статьи входят в рекомендованный перечень ВАК.

**Наиболее значимые работы по теме диссертации:**

1. Томилин В.Н., Васильева И.О., Марахова И.И., Негуляев Ю.А., Семенова С.Б. 2013. Функциональные характеристики каналов TRPV5 и TRPV6 в нормальных и трансформированных лимфоцитах человека. Цитология. 55 (5): 300–306. В статье показана экспрессия каналов TRPV5 и TRPV6 в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека.
2. Vassilieva I.O., Tomilin V.N., Marakhova I.I., Shatrova A.N., Negulyaev Y.A., Semenova S.B. 2013. Expression of Transient Receptor Potential Vanilloid Channels TRPV5 and TRPV6 in Human Blood Lymphocytes and Jurkat Leukemia T Cells. Journal of Membrane Biology. 246(2):131-40. В статье проведено сравнение характеристик и количества каналов TRPV5/V6 в клетках лимфоидной лейкемии линии Jurkat и здоровых лимфоцитах

периферической крови человека. Также произведен анализ механизма регуляции этих каналов.

**На диссертацию и автореферат поступили отзывы:**

1. Заведующего лабораторией Молекулярной физиологии клетки ФГБУН Института биофизики клетки РАН, доктора биологических наук, профессора **Колесникова Станислава Сергеевича**. Отзыв положительный, содержит вопросы.

- I. Нет прямой связи между данными иммунофлуоресцентного анализа и RT-PCR и результатами электрофизиологических экспериментов. Учитывая отсутствие специфичных блокаторов TRPV5 и TRPV6, а также то, что эти канальные белки могут образовывать гетероолигомеры, невозможно однозначно приписать наблюдавшуюся канальную активность в лимфоидных клетках только TRPV5 или TRPV6. Возможно, какой-то из идентифицированных по электрической активности каналов функционирует как TRPV5/V6 комплекс.
- II. Вывод 3 вполне согласуется с имеющимися литературными данными и свидетельствует в пользу обозначенной выше возможности. Однако, в рамках автореферата я не нашел никаких свидетельств, полученных собственно автором, которые бы его достаточно поддерживали. Пространственная колокализация иммунофлуоресцентных сигналов TRPV5 или TRPV6 не является достаточным основанием для упомянутого утверждения автора.

В заключении отмечу, что сформулированные выше вопросы не ставят под сомнение основополагающие результаты рецензируемой работы. По актуальности сформулированных задач, спектру используемых методов и качеству полученных данных она в целом

представляет собой законченное исследование хорошего класса, вполне удовлетворяющее требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология. У меня нет сомнений в том, что ее автор – Томилин В.Н. - заслуживает присвоения искомой степени.

2. Заведующей кафедрой физиологии человека и животных Казанского Федерального университета, доктора биологических наук, профессора **Ситдиковой Гузели Фаритовны** и доцента кафедры физиологии человека и животных Казанского Федерального университета, кандидата биологических наук, **Яковлева Алексея Валерьевича**. Отзыв положительный, без замечаний.

3. Заведующей Лабораторией ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН, доктора биологических наук, **Казначеевой Елены Валентиновны**. Отзыв положительный, содержит вопросы.

- I. Если данные каналы относятся к классу  $\text{Ca}^{2+}$  проводящих каналов, какова их проводимость в нормальных физиологических условиях?
- II. Каков профиль проницаемости данных каналов для моновалентных и дивалентных катионов?
- III. Данные каналы, будучи экзогенно экспрессированными имеют строгую зависимость от концентрации кальция внутри клетки. Существует ли такая зависимости у эндогенных каналов в клетках крови?

Поставленные вопросы не подвергают сомнению достоверность, важности и новизну результатов.

4. Заведующего лабораторией в Отделе прикладной биологии и фармакологии Университета Техаса, кандидата биологических наук,

профессора **Починюка Олега Николаевича**. Отзыв положительный, содержит вопросы.

- I. Колокализационные исследования не являются достаточным основанием для вывода о экспрессии в клетках крови гетеротетрамеров TRPV5/V6, проводились ли другие молекулярные исследования, не вошедшие в автореферат, подтверждающие этот вывод.
- II. Для исследования каналов TRPV5/V6 используются растворы не содержащие двухвалентных катионов, но в таких условиях могут работать и различные натриевые каналы. Как вы различаете кальциевые каналы работающие в таких условиях и нативные натриевые каналы.

Сформулированные выше вопросы не ставят под сомнение основополагающие результаты рецензируемой работы.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук, **И.И. Марахова**, член Совета
2. Доктор биологических наук, профессор, **М.И. Мосевцкий**, член Совета
3. Доктор биологических наук, профессор, **Я.Ю. Комисарчик**, гл. н. с. ИНЦ РАН
4. Доктор биологических наук, профессор, **Е.С. Корнилова** член Совета
5. Доктор биологических наук, **Е.В. Казначеева**, зав. лаб. ИНЦ РАН

**Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается** высокой квалификацией выбранных специалистов в области электрофизиологии и изучения механизмов работы кальциевых каналов в клетках эукариот.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

- **разработана** новая научная концепция о роли кальциевых каналов TRPV5/V6 в регуляции кальциевого входа в клетках крови,
- **предложена** оригинальная научная методика использования измерения функциональной активности каналов TRPV5/V6 в нормальных и трансформированных клетках крови для оценки их пролиферативного статуса,
- **доказана** экспрессия кальциевых каналов TRPV5/V6 в клетках Jurkat и лимфоцитах периферической крови человека. Показаны различия в количестве и субъединичном составе каналов TRPV5/V6 в плазматической мембране нормальных лимфоцитов человека по сравнению с клетками Jurkat,
- **введены новые представления** о типе кальциевых каналов и механизмах их регуляции с помощью внеклеточного pH и эндо/экзоцитоза.

**Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:**

- **доказаны** различия в уровне функциональной активности каналов TRPV5/V6 в нормальных лимфоцитах и трансформированных клетках Jurkat,
- **применительно к проблематике диссертации результативно использован** комплекс современных биофизических и молекулярных методов, включая метод исследования ионных каналов плазматической мембраны (патч-кламп в различных конфигурациях), иммунофлуоресцентные измерения, культивирование клеток Jurkat, выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови человека, а также методы статистической обработки экспериментальных данных,
- **изложены** новые экспериментальные факты, показывающие существенную роль pH в регуляции активности кальциевых каналов TRPV5/V6 в клетках крови,
- **раскрыты** механизмы регуляции активности кальциевых каналов TRPV5/V6, посредством изменения численности каналов на плазматической

мембране в клетках Jurkat. Показано увеличение активности кальциевого входа при защелачивании наружного раствора и уменьшение кальциевого входа при закислении раствора,

- **изучена** роль клатрин/динамин-зависимого эндоцитоза в регуляции активности (посредством контроля численности) кальциевых каналов TRPV5/V6 в мембране клеток,

- **проведена** оценка возможности, не влияя на экспрессию кальциевых каналов, воздействовать на кальциевую сигнализацию в клетках крови посредством факторов, влияющих на везикулярный транспорт.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

- **разработано и внедрено в практику научного исследования** измерение функциональной активности и определение механизмов регуляции кальциевых каналов TRPV5/V6 в нормальных и трансформированных клетках крови,

- **определены** перспективы возможного практического применения результатов исследования: для использования идентифицированных каналов в качестве терапевтических мишеней для лекарственной и генной терапии,

- **представлены** новые данные, показывающие, что повышенный уровень экспрессии каналов TRPV5/V6 и в особенности TRPV6 коррелирует с трансформацией клеток крови.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила:**

- **результаты**, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании (установка патч-кламп фирмы НЕКА; конфокальный микроскоп Leica SP-5), выбор использованных методов обоснован спецификой работы и поставленными в работе задачами, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистического анализа,

- **теория** о возможной корреляции между злокачественным трансформированием клеток и экспрессией определенных ионных каналов построена на известных литературных фактах, указывающих на увеличение экспрессии канала TRPV6 при прогрессии рака предстательной железы, грудных желез, щитовидной железы и толстого кишечника,
- **идея** о значимости кальциевых каналов TRPV5/V6 в физиологических и патологических условиях основана на анализе современных литературных данных, а также на собственных экспериментальных материалах,
- **использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по тематике диссертации,
- **установлено**, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным,
- **использованы** современные экспериментальные подходы (метод патч-кламп, конфокальная микроскопия, иммунофлуоресцентное окрашивание, культивирование клеток Jurkat и выделение лимфоцитов периферической крови человека), и адекватные методы статистической обработки результатов (Clampfit, ImageJ, Microsoft Excel).

**Личный вклад соискателя состоит в:**

непосредственном участии соискателя в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с применением современных электрофизиологических и иммунофлуоресцентных методов исследования. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований, подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации, неоднократно представлял материалы диссертации на отечественных и зарубежных конференциях.

Диссертация посвящена идентификации и механизмам регуляции кальциевых каналов в нормальных и трансформированных лимфоцитах человека и является оригинальным, законченным (в рамках поставленных

задач) научно-квалификационным исследованием, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.).

На заседании 27.02.2015 г. Диссертационный совет решил присудить **ТОМИЛИНУ ВИКТОРУ НИКОЛАЕВИЧУ** учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве **22 человек**, из них **докторов по специальности рассматриваемой диссертации -11**, участвовавших в заседании из 24 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

**«ЗА» - 22, «ПРОТИВ» - НЕТ, недействительных бюллетеней – НЕТ.**

Председатель

Диссертационного совета Д002.230.01

Доктор биологических наук, профессор

Юдин А.Л.

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д002.230.01

Кандидат биологических наук

Каминская Е.В.

«2» марта 2015

