

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Чубинского-Надеждина Владислава Игоревича

на диссертационную работу **Зайцевой Анастасии Константиновны**

«Исследование потенциал-зависимых натриевых каналов при каналопатиях»,
представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.5. – “Физиология человека и животных”

Актуальность темы диссертации

Потенциал-зависимые натриевые каналы сердца Nav1.5 обеспечивают деполяризацию в ходе фазы 0 потенциала действия в кардиомиоцитах. Патологическая роль данных каналов подчёркивается огромным количеством патогенных мутаций в гене *SCN5A*, кодирующем Nav1.5, и в генах, кодирующих его белки-партнёры.

Для выполнения диссертационного исследования А. К. Зайцевой использовался набор современных методик электрофизиологии и молекулярной биологии. С помощью сайт-специфического мутагенеза были сгенерированы генетические конструкции с мутациями, обнаруженными у пациентов центра им. В. А. Алмазова, далее эти мутанты экспрессировались в клеточной линии НЕК293-Т и были функционально охарактеризованы методом patch-clamp в отведении от целой клетки. Полученные данные об изменениях электрофизиологических свойств при мутациях Y739D и A1294G способствуют пониманию роли коротких внеклеточных липкеров канала Nav1.5 в реализации его функций. Далее была сформулирована и экспериментально проверена гипотеза о существовании контакта E1295:R1739. Автор показал, что этот контакт играет важную роль в обеспечении переходов канала между различными состояниями и его разрушение приводит к изменению функционирования Nav1.5.

Установление патогенности вариантов гена *SCN5A* имеет колоссальное значение для своевременной диагностики наследственных каналопатий и подбора правильной стратегии лечения, так как для многих *SCN5A*-ассоциированных синдромов внезапная сердечная смерть часто является первым наблюдаемым клиническим событием. Классический подход медицинской генетики подразумевает накопление данных о пациентах с одной и той же мутацией, возникающей независимо в разных семьях. Однако, подавляющее число генетических вариантов являются редкими и относятся к вариантам неизвестной клинической значимости. Для вариантов неизвестной значимости отсутствуют

клинические рекомендации. Предложенные теоретические подходы позволяют классифицировать часть вариантов как потенциально повреждающие и, тем самым, облегчают клиницистам стратификацию риска для пациентов-носителей данных мутаций.

В связи с вышесказанным диссертационная работа А.К. Зайцевой представляет собой актуальное исследование, которое направлено на решение одной из ключевых проблем физиологии ионных каналов и медицинской генетики.

Структура и общая характеристика диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов, обсуждения и выводов. Работа изложена на 180 страницах машинописного текста и содержит 7 таблиц и 32 рисунка. Список литературы содержит 292 библиографических источника.

Обзор литературы посвящён детальному анализу биологии и физиологии потенциал-зависимых натриевых каналов сердца. Автором приведена информация о мутациях, ассоциированных с нарушениями функциональных характеристик канала Nav1.5. Была проделана колоссальная работа по анализу имеющихся литературных данных о мутациях в гене *SCN5A*, их локализации и влиянии на электрофизиологические характеристики канала.

Из анализа информации, предоставленной в обзоре автором, логично вытекают актуальность, цель и задачи исследования, сформулированные автором. Обзор литературы демонстрирует всестороннее и глубокое изучение автором современного состояния проблем исследования потенциал-зависимых натриевых каналов при каналопатиях.

Во второй главе представлены материалы и методы исследования. Дается характеристика модельного объекта и детально описываются методические подходы. Правильность выбора методов, их адекватность поставленным задачам не вызывает сомнения. Использование широкого методического арсенала позволило автору исследовать функциональные характеристики мутантов Nav1.5 с должной степенью оперативности и точности измерений. Важно отметить, что исследование функциональных свойств различных мутантов натриевых каналов сердца выполнено на современном уровне. Отдельным плюсом диссертационной работы является предсказание потенциальной патогенности ряда генетических вариантов с помощью методов теоретической биологии.

В последующей главе подробно излагаются результаты собственных исследований диссертанта. В разделе результаты подробно описан эффект мутаций Y739D и A1294G на функциональные характеристики канала Nav1.5. Полученные автором данные согласуются с работами других исследователей по изучению влияния мутаций в коротких внеклеточных линкерах на активность потенциал-зависимых натриевых каналов. Представлены

убедительные экспериментальные доказательства существования контакта E1295:R1739 в структуре канала.

Заключительная часть результатов посвящена анализу структуры Nav1.5 и предсказанию потенциально повреждающих вариантов. Выдвинуто предположение, что если существует контакт в структуре канала и для обеих аминокислот, образующих контакт, имеются генетические варианты, идентифицированные у пациентов, то такие варианты следует рассматривать как потенциально повреждающие. Эта гипотеза может найти дальнейшее применение в области диагностики наследственных аритмий.

В заключении автор на основании убедительных и достоверных экспериментальных данных иллюстрирует эффективность интеграции экспериментального и теоретического подходов для изучения общей физиологии ионных каналов Nav1.5 в норме и патологии.

Научная новизна исследования

В представленной работе впервые получены данные об изменениях функциональных характеристик Nav1.5 при мутациях A1294G и Y739D, обнаруженных у пациентов с наследственными нарушениями сердечного ритма. Впервые предсказано и показано существование межсегментного контакта E1295:R1739 и проиллюстрирована его роль в обеспечении функции потенциал-зависимых натриевых каналов сердца.

Практическая значимость исследования

Практическая значимость работы состоит в экспериментальном подтверждении повреждающего действия мутаций A1294G и Y739D на модели клеток линии HEK293-T. Особую практическую значимость имеет предсказание списка потенциально-повреждающих мутаций, которые впоследствии могут быть переклассифицированы в патогенные. Полученные данные могут напрямую применяться в диагностике наследственных аритмий, стратификации риска у пациентов и для подбора адекватной терапевтической стратегии, так как патогенность мутации является показанием для установки кардио-вертер дефибриллятора с целью предотвращения внезапной смерти от остановки сердца.

Достоверность и обоснованность положений, результатов и выводов диссертации

Результаты работы изложены в четырёх выводах и трёх положениях, выносимых на защиту. Их обоснованность не вызывает сомнений, поскольку они полностью следуют из результатов, проведённых исследований, данные получены на большом количестве клеток и достаточном числе независимых трансфекций и проанализированы с применением современных методов статистического анализа.

По теме диссертации опубликовано 8 статей в журналах из перечня ВАК и международных баз данных Scopus и Web of Science. Полученные результаты были представлены на 5 международных и Всероссийских конференциях.

Соответствие содержания диссертации указанной специальности

Представленная диссертация соответствует специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации

Автореферат полностью отражает структуру и содержание диссертации.

Вопросы и замечания

В ходе ознакомления с диссертацией возник ряд вопросов и комментариев:

1. Обзор литературы. На мой взгляд, не хватает главы про фармакологические модуляторы активности потенциал-зависимых натриевых каналов, так как эти модуляторы активно применяются в различных исследованиях.
2. Обзор литературы. Глава про жизненный цикл каналов. В первом предложении идет речь про определенные микродомены плазматической мембраны. Какие именно микродомены имеются ввиду? Речь идет о липидных рафтах плазматической мембраны?
3. В обзоре литературы описан альтернативный сплайсинг Nav, который может существенно влиять на их свойства. Может ли происходить альтернативный сплайсинг каналов в используемых клеточных моделях?
4. Известно ли что-нибудь про экспрессию эндогенных Nav каналов или их регуляторных субъединиц в используемых клеточных моделях? Если да, то могут ли эндогенные каналы или дополнительные субъединицы влиять на свойства и характеристики искусственно экспрессируемых каналов Nav?
5. Может ли снижение пиковой плотности токов быть вызвано худшим встраиванием каналов (т.е. меньшим числом встроившихся каналов), а не изменениями их проводящих свойств?

Приведённые замечания не умаляют значения, важности и достоверности проделанной автором теоретической и экспериментальной работы.

Резюмируя, следует отметить чёткую постановку задач на каждом этапе исследования, логическую часть всех частей диссертации, ясное изложение результатов, хорошо иллюстрированное графиками и таблицами, исчерпывающий перечень апробаций и публикаций диссертационных материалов.

Таким образом, исследования диссертанта являются необходимым этапом для продолжения фундаментальных научных поисков в области установления структурно-молекулярных механизмов развития натриевых каналопатий.

Заключение.

Диссертация А.К. Зайцевой представляет собой законченную научную работу, обобщающую полученные автором новые факты. Её можно квалифицировать как значимое достижение в области физиологии ионных каналов. Результаты работы принесут ожидаемую пользу в сфере клинической практики.

Диссертационная работа А. К. Зайцевой «Исследование потенциал-зависимых натриевых каналов при каналопатиях», является научной квалификационной работой, в которой, на основании проведённых лично автором научных исследований осуществлено решение актуальной задачи современной физиологии сердца. По совокупности новизны исследования, достоверности полученных результатов, научной и практической значимости сформулированных автором выводов, работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук (пп.№9-14 «Положение о порядке присуждения учёных степеней» ВАК РФ утверждённого постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г.), а сам автор заслуживает присвоения ему искомой степени по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент

Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник,

Руководитель Группы ионных механизмов клеточной сигнализации Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки «Институт цитологии Российской Академии Наук»,


16.09.2024



Чубинский-Надеждин Владислав Игоревич



16.09.2024
Чубинский-Надеждин В.И.
Оппонент



Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение Науки «Институт цитологии Российской Академии Наук»

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4.

Телефон: +7-812-297-18-29, Сайт: www.incras.ru

E-mail: vchubinskiy@incras.ru