

УТВЕРЖДАЮ:



Директор ФГБУН Казанского
Института биохимии и биофизики
Казанского научного центра РАН
академик Гречкин А.Н.

« 17 » 2015 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Казанского Института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН
на диссертационную работу Нагаевой Элины Ильдаровны «Поиск и изучение лигандов
протон-активируемых ионных каналов», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Протон-вызванные токи впервые были зарегистрированы О.А.Крышталем и В.И.Пидопличко в 1980 году в нейронах спинно-мозговых ганглиев крыс. Позже в конце 90-х годов, благодаря развитию молекулярно-генетических методов, был клонирован первый протон-активируемый ионный канал, экспрессия которого в ооцитах лягушки *Xenopus laevis* приводила к появлению транзиентных токов через эти клетки в ответ на предъявление закисленного раствора. С тех пор протон-активируемые ионные каналы, или ASICs, были обнаружены во многих живых организмах, включая человека, а их преимущественная локализация в нервной системе сделала их одним из важнейших объектов исследования современной физиологии и фармакологии. Не смотря на это, по сей день набор фармакологических инструментов, способных избирательно модулировать работу данного типа каналов, довольно ограничен, что, в свою очередь, сильно затрудняет определение непосредственной физиологической роли ASICs. Задача также усложняется множественностью субъединиц этих рецепторов, способных образовывать тримерный канал в различных комбинациях, что, в свою очередь, определяет разнообразие биофизических свойств и чувствительность к лигандам. Таким образом, исследование, предпринятое Нагаевой Э.И., является весьма актуальным на сегодняшний день, поскольку посвящено именно этим двум проблемам: поиску лигандов протон-активируемых ионных каналов среди синтетических и эндогенных соединений, а также изучению их субъединичной специфичности.

Общая характеристика работы. Диссертация Нагаевой Э.И. построена по классической схеме и состоит из списка сокращений, общей характеристики работы, литературного обзора, описания использованных методик. Полученные данные подробно

описаны и проанализированы в главе «Результаты и обсуждения», за которым следуют разделы «Заключение» и «Выводы». Обзор литературы построен чётко и логично и полностью освещает основные достижения, имеющиеся в изучаемой области. Наличие иллюстративного материала в этом разделе (8 рисунков) сильно облегчает его восприятие. Стоит отметить развёрнутость и актуальность изложенного материала, многие источники датируются 2014-2015 годами, и в большинстве своём (190 из 193) являются оригинальными статьями из престижных международных журналов, поскольку русскоязычная литература по данной теме практически отсутствует.

В работе были использованы современные методы молекулярной биологии и клеточной электрофизиологии. Для контролируемой экспрессии рецепторов нужного субъединичного состава проводилась липофектаминавая трансфекция клеток линии СНО плазмидами. Для идентификации трансфецированных клеток использовалась флуоресцентная метка (дополнительная плазида, кодирующая последовательность белка GFP). Трансмембранные токи, вызванные аппликацией кислого раствора, регистрировались при помощи метода локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Использованные методические приёмы адекватны поставленным задачам.

Описание и обсуждение результатов состоит из четырёх следующих друг за другом частей, порядок которых помогает уловить логику развития исследования. Первая часть посвящена действию четырёх первоначально отобранных соединений на функционально-активные гомомерные каналы. Установлено, что они способны модулировать работу всех гомомерных ASICs, однако направленность их действия зависит от субъединичного состава. Так одно и то же соединение - 9-аминоакридин - было наиболее эффективным ингибитором ASIC1a каналы и при этом никак не действовало на гомомеры ASIC2a. В то же время производное фенилциклогексила, ИЭМ-1921, наиболее эффективно потенцировало ASIC2a, но не проявило активности на ASIC1a даже в высоких концентрациях. Эта часть работы нашла полное отражение в статье, опубликованной в престижном международном журнале *Neuropharmacology*, и, соответственно, прошла тщательную и квалифицированную проверку.

Поскольку все проанализированные вещества состояли из гидрофобной части и аминогруппы, структурные детерминанты их разнонаправленного действия на отдельные субъединицы оставались не ясны. В связи с этим, вторая часть исследования посвящена фармакологическому структурно-функциональному анализу, с использованием 7-ми структурных аналогов 9-аминоакридина, 4-х производных фенилциклогексила и 7-ми производных адамантана. В этой части работы впервые был выявлен потенциатор ASIC1a каналов – производное фенилциклогексила ИЭМ-2044, структура которого отличалась от

неактивного ИЭМ-1921 лишь расстоянием между гидрофобной частью и аминогруппой. Установлено также, что монокатионные соединения являются более активными модуляторами ASICs, чем их дикатионные аналоги, а протонируемая терминальная аминогруппа является обязательной структурной детерминантой активности гидрофобных моноаминов на ASIC1a и ASIC2a каналы.

В третьей части работы начат анализ механизмов действия некоторых соединений на субъединицах ASIC1a и ASIC2a, наиболее широко представленных в ЦНС позвоночных. По результатам этой части работы выдвинуто предположение о наличие двух различных сайтов связывания для данного класса соединений в пределах ASIC канала. Выяснено, что один из этих сайтов находится на поверхности канала и отвечает за потенциал-независимое ингибирование и потенцирование. Другой сайт находится во внутримембранной части и отвечает за потенциал-зависимое ингибирование. Данная гипотеза хорошо объясняет необычный феномен потенциал-зависимого потенцирования ASIC2a каналов ИЭМ-1921, уменьшающегося при гиперполяризации мембраны и, кроме того, позволяет понять причину отсутствия чётких закономерностей в проведённом структурно-функциональном анализе.

Последняя часть работы является логичным заключением проведённого исследования – на основании структурной аналогии с потенциатором ASIC1a и ASIC2a каналов, ИЭМ-2044, подобран эндогенный модулятор протон-активируемых ионных каналов – гистамин. Показано, что он избирательно способен потенцировать гомомерные ASIC1a каналы, и что его действие зависит от концентрации протонов в среде, усиливаясь при приближении pH к менее кислым, а значит более физиологичным значениям. Последнее обстоятельство на наш взгляд является крайне важным, поскольку позволяет по-новому взглянуть на функционирование гистаминергической системы мозга, её взаимосвязь с другими неспецифическими типами каналов. Кроме того, синергетическое усиление протон-вызванного тока гистамином при слабых закислениях может указывать на значительный вклад ASIC каналов в процессы синаптической передачи, и делает поиск новых эндогенных потенциаторов крайне перспективным.

Вопросы и замечания.

Несмотря на высокий в целом уровень работы, нельзя не высказать ряд рекомендаций, Кроме того, хотелось бы получить ответы на возникшие вопросы:

1. В разделе Результаты гл.3 не хватает промежуточных выводов по описанным данным в подразделах. Это несколько усложняет восприятие материала.
2. Обращает на себя внимание тот факт, что исследуемые вещества были

эффективны только в достаточно больших концентрациях. Чем Вы объясняете этот факт?

3. На стр. 62 сказано, что “Важной характеристикой ASIC2a каналов является наличие двух компонентов ответа – ярко выраженного пикового (пик) и небольшого стационарного (плато), а также медленная кинетика спада ответа”. Чем объясняется наличие второй медленной фазы и стационарного плато ответа у ASIC2a каналов и как это связано со структурой исследуемых рецепторов?

4 На стр 62. Указано, что “ Максимальная тестируемая концентрация ИЭМ-1921 в 1000 мкМ усиливала пиковый и стационарный компоненты ответа приблизительно на $206 \pm 60\%$ (n=8) (Рис. 3.3. Б). Поскольку насыщающая концентрация соединения, при которой потенцирующий эффект выходил бы на плато, достигнута не была, параметр EC50 определить не удалось. ASIC2a”. С чем Вы связываете то, что не удалось определить насыщающую концентрацию ИЭМ-1921 при усилении пиковый и стационарный компоненты ответа при работе с ASIC2a каналов? Этот вопрос касается и других результатов, в которых не удалось определить насыщающую концентрацию вещества.

5. В работе показано, что гистамин эффективен только по отношению к одному типу каналов - ASIC1a. Поскольку было высказано предположение, что гистамин является претендентом на роль эндогенного модулятора, исследовались ли эффекты гистамина на работе нативных ASIC рецепторов? Используемая в исследованиях эффектов гистамина концентрация его была 1мМ. Возможно ли его наличие в таких концентрациях в физиологических условиях?

Научно-практическая ценность. В диссертационной работе Нагаевой Э.И. впервые показано и охарактеризовано действие нового химического класса лигандов протон-активируемых ионных каналов – гидрофобных моноаминов. Выявлены некоторые структурные детерминанты и механизмы действия этих соединений на субъединицы ASIC1a и ASIC2a, имеющих преимущественно мозговую локализацию. Кроме того, обнаружен новый эндогенный модулятор ASICs – гистамин, способный избирательно потенцировать ASIC1a каналы. Все эти результаты являются крайне важными для современной физиологии и фармакологии и могут быть использованы в специальной научной литературе, а также в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов высших учебных заведений.

Заключение.

По актуальности темы исследования и выбору методов, по оригинальности, достоверности и ценности полученных результатов исследование, проведенное Нагаевой Э.И., является работой высокого уровня. Она полностью отвечает требованиям ВАК,

предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 8 «Положений ВАК при Министерстве
Образования и Науки Российской Федерации), а ее автор заслуживает присуждения ей
искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.03.01 –
физиология.

Отзыв обсуждён и одобрен на семинаре лаборатории биофизики синаптических
процессов Казанского Института биохимии и биофизики Казанского научного центра
РАН «16» ноября 2015 года.

Заведующий лабораторией
биофизики синаптических процессов
Учреждения Российской академии наук
Казанского института биохимии и биофизики
Казанского научного центра РАН,
академик РАН, дмн.



Никольский Е.Е.

