

ОТЗЫВ

официального оппонента

**доктора биологических наук Дьяконовой Варвары Евгеньевны
на диссертационную работу Кузнецова Виктора Петровича «Генерация эндогенного
электрического потенциала в новой модельной системе», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.8. Математическая биология, биоинформатика**

Актуальность исследования. Диссертационная работа Кузнецова В.П. посвящена всестороннему анализу чрезвычайно интересного явления – способности ненейрональных клеток многоклеточного животного автономно генерировать гиперполяризующие спайки и формировать ритмическое поведение практически независимо от нервной системы. В качестве модели использованы клетки кишечника представителей разных групп нематод. Эта тема актуальна и для современной физиологии, и для эволюционно-биологических направлений. Результаты исследования заставляют пересматривать фундаментальное положение физиологии, в соответствии с которым только возбуждение опосредует связь ритмической активности с передачей сигнала другим клеткам. В работе показано, что в энтодермальных клетках нематоды противоположный по знаку процесс - торможение (гиперполяризационный спайк) может выполнять подобную функцию. Одновременно, эти результаты свидетельствуют о том, что наиболее консервативным звеном может быть резкое увеличение внутриклеточной концентрации кальция. К этому увеличению в одних клетках приводит деполяризация, что является классическим механизмом для нейронов, а в других - гиперполяризация, что показано автором на клетках кишечника нематод. В области эволюционной нейробиологии последних лет в связи с совершенствованием методов полногеномного секвенирования и транскриптомики одиночных клеток формируются прорывные исследования, посвященные происхождению нейронов, нервных систем, нейротрансмиттеров, синапто- и электрогенеза. Полученные автором данные об эндогенной генерации поляризующих ритмов в ненервных клетках представляют большой интерес для специалистов в этой области. Актуальны и оригинальны подходы автора к изучению этого явления. Они основаны на блестящем совмещении традиционных электрофизиологических исследований и новейших методов математического моделирования и биоинформатики, что позволило провести полноценный анализ механизмов, стоящих за генерацией околominутных ритмов в кишечнике нематод. Этот подход может (и должен) служить образцом для других исследователей.

Научная новизна. В работе описан новый тип ритмических изменений мембранного потенциала (МП) в модельной системе, клетках кишечника у нематоды *Heterorhabditis megidis*. Выявленные изменения поразительно сходны с классическим потенциалом действия возбудимых клеток, но при этом обладают обратной полярностью, аналогичной амплитудой и значительно более длительным периодом. Наблюдаемые колебания МП синхронизированы с кальциевой волной в клетках кишечника, и наблюдались как в целом организме, так и в фрагментах передней или задней части нематоды, и в системе из нескольких изолированных клеток. Показано, что сгенерированный в энтодермальных клетках потенциал способен передаваться от клетки к клетке.

Передача осуществляется как за счет электрических связей между клетками, обусловленных щелевыми контактами, так и посредством выброса медиаторов из клеток кишечника.

Анализ зависимости генерации ритма от уровня мембранного потенциала показал, что некоторые характеристики зависят от него (например, возможность перезапуска при сильной кратковременной гиперполяризации или изменение частоты ритма при длительной деполяризации/гиперполяризации). Но при этом осцилляции продолжаются даже при длительной фиксации потенциала на различных уровнях.

На основе анализа основных характеристик ритмического процесса создана модель, включающая три типа проводимости (три типа ионных каналов). Для каждого типа проводимости были предложены возможные молекулярные участники, предсказанные с учетом известных литературных данных и биоинформатического анализа баз данных и данных scRNA-seq. На основе анализа геномных и транскриптомных данных библиотек высказано предположение о сходстве и разнообразии механизма у эволюционно отдаленных видов нематод. Эти предположения проверены в фармакологических и физиологических исследованиях, показавших, в частности, наличие схожего ультрадианного ритма у нематоды *E. brevis*, находящейся у основания эволюционного дерева нематод.

Научная и практическая значимость

Полученные в работе данные представляют значительную ценность для науки и позволяют по-новому взглянуть на роль электрического возбуждения-торможения в клетках, механизмы формирования ритмичного поведения, роль нервной системы в организации поведения. Результаты позволяют провести аналогию между кишечными клетками нематод и возбудимыми клетками, такими как нейроны или мышечные клетки. Это открытие предлагает новую перспективу в изучении эволюции нейронов и побуждает к пересмотру существующего понимания возбудимых клеток, расширяя традиционные представления о функциональных возможностях различных типов клеток.

Исследования свойств щелевых, ионных каналов и транспортеров в генерации и распространении сигнальной волны важны для понимания работы нервной и сердечно-сосудистой системы, что определяет практическую значимость проекта. Кроме того, результаты, изложенные в диссертации, могут быть рекомендованы к использованию в образовательных курсах по современной физиологии, эволюционной нейробиологии и актуальной методологии биологических исследований.

Диссертация Кузнецова Виктора Петровича по содержанию, актуальности, новизне, фундаментальной значимости, научному и методологическому уровню, не только полностью соответствует, но существенно превышает требования, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа блестяще и оригинально спланирована, и грамотно выполнена. Результаты являются достоверными и воспроизводимыми. Все научные положения строго обоснованы. Выводы из диссертационной работы соответствуют поставленным задачам и базируются на совокупности экспериментальных данных, проанализированных с использованием адекватных статистических методов. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно. Результаты диссертационной

работы опубликованы в семи статьях в высокорейтинговых рецензируемых зарубежных и российских журналах. Автореферат отражает содержание диссертации.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах, содержит 28 качественных рисунков. Она построена по одному из традиционных планов и включает в себя введение, обзор литературы, результаты и обсуждение (5 глав), описание материалов и методов исследования, заключение и выводы, список литературы (144 источника).

Во введении обоснована актуальность темы работы, корректно сформулированы цель и задачи исследования, отмечена научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Обзор литературы соответствует теме исследования и включает восемь разделов: 1. Ритмические процессы. Ультранизкие ритмы 2. Механизм дефекационной моторной программы нематод 3. Роль инозитолтрифосфата в инициации и модуляции ритма. Кальций-зависимый выброс кальция. 4. Роль ионов кальция в инициации дефекационной моторной программы и синхронизации работы клеток. Ca^{2+} передача сигнала и Ca^{2+} волны 5. Изменения уровня мембранного потенциала и потенциал действия 6. Мембранные белки дефекационной моторной программы нематод 7. Модельные организмы – нематоды 8. Многообразие функций энтодермальных клеток кишечника нематод. Он дает полное и необходимое описание имеющейся информации в этой области. К числу небольшого недостатка можно отнести использование в обзоре собственных результатов автора, ссылки на статьи, в которых представлены результаты диссертационной работы. В связи с этим, в конце обзора, и в «степени разработанности темы» не хватило четкого обозначения недостающей информации, на получение которой направлено данное диссертационное исследование. Обзор предваряет уже будущие исследования, а не данную диссертационную работу.

Пять глав, посвященных результатам и их обсуждению, производят самое благоприятное впечатление. Оно объясняется безукоризненной логикой и последовательностью проведенных экспериментов, их количеством и качеством обсуждения. Здесь особенно следует отметить: (1) удачный выбор нового объекта, близкородственной *C. elegans* нематоды с более крупными клетками кишечника, доступными для полноценного электрофизиологического анализа на организменном и клеточном уровне; и (2) метод решения вопроса о механизмах генерации ритма в одиночной клетке: от анализа данных электрофизиологических исследований, через построение модели, понимание свойств, которыми должны обладать каналы-кандидаты на участие в ритмогенезе, к биоинформатическому поиску конкретных каналов с подобными свойствами, дифференциально экспрессирующихся в клетках кишечника нематод, и проверке в фармакологических экспериментах некоторых свойств найденных кандидатов.

В главе «материалы и методы» автор подробно описывает используемые экспериментальные модели и методики. Как уже было отмечено выше, применено большое количество разных подходов для решения поставленных задач, включая последние достижения в биоинформатическом анализе транскриптомов одиночных клеток.

К тексту диссертационной работы серьезных замечаний нет, он производит очень хорошее впечатление. К числу небольших замечаний можно отнести, главным образом,

стилистические и грамматические ошибки в русском языке, неудачные формулировки. Перечислю.

Стр. 7 второй абзац снизу - аббревиатура обозначений трех этапов ДМП непонятна. Что она означает, почему такое сокращение выбрано? Третий этап, в отличие от первых двух кириллических, обозначен, по какой-то причине латиницей

Стр. 8 второй абзац «электрофизиологические же эксперименты», же не нужно, и весь абзац – повтор информации, которая была всего на страницу выше

Стр. 12 первый абзац.: «Помимо исследования механизма ДМП для одной конкретной нематоды разных представителей нематод».

Неудачная формулировка, «для одной конкретной» - следует исключить, а слово «разных» поставить после «представителей» и лучше в сочетании со словом «групп». Помимо исследования механизма ДМП у нематоды *H. megidis*, работа приводит результаты изучения и сравнения проявлений ритмического процесса у представителей других групп нематод.

Стр. 13 Эксперименты с фиксацией потенциала помогли установить двоякую природу наблюдаемого процесса (духовно-материальную, квантово-волновую?). Лучше было бы пояснить сразу, что имеется ввиду, не оставляя этот загадочный дуализм до знакомства с результатами.

- Стр. 13, 3 абзац «высчитывалась по закону Ома» – высчитывалась по формуле закона Ома

Стр. 95 «Учитывая эти схожести» - правильно: учитывая это сходство

Стр. 96 «общий не нервный ритмический механизм». Правильнее «Ненейрональный ритмический механизм»

Стр. 103 «Нейроны обмениваются информацией друг с другом и с другими клетками организма через синапсы, которые бывают двух типов: химические и электрические» здесь автор существенно ограничил типы межнейрональной коммуникации. На этом фоне экстрасинаптическая коммуникация клеток кишечника представляется отличием от нейрональной коммуникации, что неверно. Экстрасинаптическая коммуникация есть и у нейронов, в частности у *C. elegans*.

- там же

«Механизмы передачи сигналов от клеток кишечника к другим клеткам в нематодах можно сравнивать с синаптическими функциями нейронов.» Почему же они синаптические, если речь идет как раз об экстрасинаптической, объемной секреции, которая есть и у нейронов, и у клеток кишечника? Способность обмениваться химическими сигналами, в том числе и нейротрансмиттерами, найдена у многих клеток, в этом смысле и исключительность нейронов, и

уподобление энтероцитов по этому признаку нейронам кажется преувеличением. С нейронами и другими быстрополяризующимися клетками их больше роднит именно электрогенез, а не химическая коммуникация.

Кроме этих небольших замечаний, есть два вопроса, которые, было бы интересно обсудить

1. Рисунок 11. Очевидно, что разброс на восходящей стороне потенциала больше, чем на нисходящей. Можно дать этому явлению объяснение? Механизмы, отвечающие за начало генерации спайка более лабильны, чем процессы его прерывающие?
2. В чем может быть биологический смысл строить дефекационный ритм на гиперполяризации клеток? Можно ли его сделать на традиционной деполяризации? Это случайность, подхваченная механизмами самосборки в эволюции? Или дает какие-то преимущества? В чем они могут быть?

Указанные замечания не умаляют значимости этого выдающегося диссертационного исследования. Диссертация Кузнецова Виктора Петровича полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., №650 от 29.05.2017г., №1024 от 28.08.2017г., №1168 от 01.10.2018г.). Таким образом, соискатель Кузнецов Виктор Петрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по Математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных, профессор РАН

главный научный сотрудник Лаборатории нейробиологии развития

Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Дьяконова Варвара Евгеньевна

Контактные данные:

Тел. 8-916-585-09-85, e-mail: dyakonova.varvara@gmail.com

Адрес места работы:

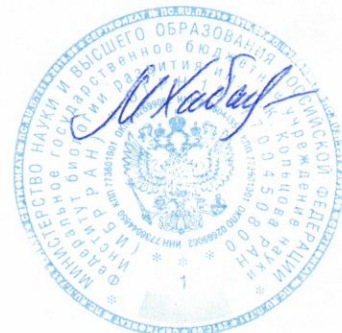
, г. Москва, ул. Вавилова д. 26,

«Федеральное государственное бюджетное учреждение науки биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук»

Подпись В.Е. Дьяконовой заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «ИБР РАН»

к.б.н. Хабарова Марина Юрьевна



В.Е. Дьяконова
18 ноября 2014г.