

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кравцовой Виолетты Васильевны «Функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы в скелетной мышце», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01– физиология

Na,K-АТФаза является классическим объектом нейрофизиологии, поскольку обеспечивает одну из основных функций клетки – поддержание градиентов основных клеточных и внеклеточных катионов. Она осуществляет преобразование химической энергии АТФ в энергию неравновесного распределения ионов. В дальнейшем эта энергия преобразуется в энергию мембранного потенциала, которая, в свою очередь, используется для генерации и проведения электрических сигналов. К тому же Na,K-АТФаза сама создает весьма заметный компонент потенциала за счет несимметричного переноса ионов. Na⁺/K⁺-АТФаза была открыта Йенсом Скоу в 1957 году. Он выделил этот фермент из периферических нервов с помощью убаина — специфически связывающегося с АТФазой гликозида. В 1997 году за это открытие он был удостоен Нобелевской премии по химии.

Неудивительно, что такой важный фермент является предметом интенсивных исследований. Как и в случае многих других белков простая однородная парадигма функции Na⁺/K⁺-АТФазы устарела. В настоящее время совершенно ясно разнообразие функций, изоформ и отдельных пулов Na⁺/K⁺-АТФазы. Хотя изоформы имеют высокую степень гомологии, они различаются по чувствительности к ионам натрия и калия, АТФ, гормонам и физиологическим стимулам, а также к специфическому ингибитору Na,K-АТФазы убаину и другим сердечным гликозидам. Было показано, что градиенты Na⁺ и K⁺ в покое в основном поддерживает 1-изоформа, выполняющая основную насосную функцию; вклад 2-изоформы в поддержание ионных градиентов и мембранного потенциала покоя мышечных волокон невелик. Обнаружена существенная неоднородность распределения 1- и 2- изоформ Na,K-АТФазы в плазматической мембране и таких мембранных компартментах, как Т-система и кавеолы. Важнейшим достижением последних лет стало выявление сигнальной функции Na,K-АТФазы, что расценивается в качестве нового принципа регуляции свойств клетки. Именно анализ подобных тонких явлений и является на сегодняшний день предметом активного изучения. Именно этому, как следует из

формулировки цели и задач, посвящена работа В.В.Кравцовой, актуальность которой, таким образом, несомненна.

Диссертационная работа состоит из четырех больших блоков: локализация и функционирование 2-изоформы атфазы в концевой пластинке, хронические эффекты никотина в скелетной мышце изоформ-специфическое влияние двигательной разгрузки на атфазу, кардиотонические стероиды и сократительная функция. Наличие нескольких частей исследования типично для диссертаций на соискание степени доктора наук, однако во многих случаях их объединение под одной «обложкой» является искусственным. Рассматриваемая работа лишена подобного недостатка: все части действительно органично связаны единой целью исследования и представляют собой подходы к решению фундаментальной научной проблемы.

Следует отметить и разнообразие методик, используемых автором для решения конкретных задач. В комплекс экспериментальных подходов входит Микроэлектродная регистрация, Механография, Конфокальная микроскопия, Количественная полимеразная цепная реакция, Вестерн-блот анализ, Пламенная фотометрия, Двигательная разгрузка, Локальная доставка никотина к мышце.

При решении каждой конкретной задачи автором получены результаты высокого качества и научной значимости. Это подтверждается и внушительным списком опубликованных работ, опубликованных в научных журналах, как российских, так и международных, имеющих высокий научный престиж и жесткую систему рецензирования. Таким образом, новизна и достоверность результатов сомнения не вызывают.

В работе в частности установлен адаптационный характер функциональных изменений 2-изоформы Na,K-АТФазы; эти изменения проявляются по-разному для постсинаптического и внесинаптического пулов 2-изоформы без нарушения её локализации в сарколемме. Наблюдаемые изменения сопровождаются дестабилизацией липид-упорядоченной фазы сарколеммы за счет частичной утраты мембранного холестерина, а также нарушениями распределения никотиновых холинорецепторов и структуры концевых пластинок.

Также среди полученных автором результатов хочется отметить разработку гипотезы о существовании функционального молекулярного комплекса АТФазы с никотиновым холинорецептором. По мнению автора, результатом этого взаимодействия является локальная гиперполяризация мембраны концевой пластинки, вызываемая наномолярными концентрациями негидролизованного ацетилхолина, которую можно

рассматривать как физиологический механизм, препятствующий инактивации Na^+ каналов и поддерживающий гарантийный фактор нервно-мышечной передачи. Хотя эта гипотеза требует дальнейшей верификации, она дает перспективное направление дальнейших исследований.

Сама диссертационная работа построена по классической схеме, хорошо написана и иллюстрирована. Следует положительно оценить то, что помимо общего обзора литературы и общего обсуждения, каждая из больших глав имеет собственное введение и обсуждение. Такое построение заметно облегчает восприятие материала. Выводы работы корректно отображают суть работы. При этом хочется отметить, что выводы не просто кратко повторяют результаты, а представляют собой их обобщение. Именно такого рода выводов стоит ожидать от диссертации на соискание степени доктора наук.

У меня нет значительных замечаний по существу работы. И все же следует высказать ряд вопросов и замечаний.

1. При обсуждении вопроса взаимодействия АТФазы и никотиновых холинорецепторов как-то упущена возможность опосредования этой связи посредством ионов кальция, которые также проходят через канал холинорецептора. Эти ионы могут оказывать локальное воздействие прежде чем будут хелатированы буфером. Каково мнение автора по поводу такой возможности.
2. Современная микроскопия (FRET) позволяет установить факт близкой локализации белков. Считает ли автор возможным использование этих подходов для выявления локализации АТФазы и холинорецепторов?
3. Вопрос о функциональной значимости обнаруженных эффектов требует дополнительного пояснения. Обнаруженные эффекты достаточно тонкие. Их роль была бы понятна в центральных синапсах, где тонкий баланс возбуждения и торможения играет решающую роль. Но неочевидна их значимость в нервно-мышечном синапсе, обладающем высоким коэффициентом надежности.

В целом, диссертация Кравцовой Виолетты Васильевны на тему «Функциональная гетерогенность Na,K -АТФазы в скелетной мышце», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01– физиология, по содержанию, актуальности и научной новизне, объему экспериментального исследования, теоретическому и практическому значению полученных данных

