

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института физиологии им.
И.П. Павлова Российской академии наук
д.б.н.,
Дюжикова Наталья Алековна



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Ротова Александра Юрьевича «Чувствительность и
быстродействие палочек и колбочек: эволюционный аспект»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности

03.00.09 - «Физиология человека и животных»

Актуальность темы исследования, обоснованность и достоверность результатов

В диссертации поставлены задачи оценки основных параметров каскада фототрансдукции, определяющих чувствительность и кинетику ответов на свет типичных палочек и колбочек позвоночных в сравнении с двумя типами переходных фоторецепторов – палочкоподобных рецепторов речной миноги (*Lampetra fluviatilis*), и зеленых палочек озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), – с уточнением их функциональной роли.

Актуальность данного направления обусловлена тем, что для большинства фоторецепторов переходного типа функциональные характеристики электрических ответов, определяющие их чувствительность и быстроедействие, остаются малоизученными, а анализ биохимии зрительных пигментов дает противоречивые результаты. Уточнение функциональной роли и выявление адаптации под нее конкретных белков и реакций каскада фототрансдукции является крайне актуальной задачей, так как позволит уточнить происхождение этих уникальных фоторецепторов. Кроме того, понимание биологии фенотипически промежуточных рецепторов критически важно для развития трансляционной медицины и других сфер.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе А.Ю. Ротова впервые изучен вопрос о происхождении задержки фотоответа и выявлены конкретные этапы, определяющие длительность этой стадии. Впервые оценена минимальная задержка фотоответа для переходных фоторецепторов круглоротых и амфибий в сравнении с типичными палочками и колбочками.

В диссертации впервые проведено сравнение кинетических параметров фотоответа коротких рецепторов миноги с типичными палочками позвоночных и выявлена их низкая в сравнении с типичными палочками абсолютная чувствительность, а также определяющие ее особенности кинетики каскада фототрансдукции. Впервые на уровне изолированных клеток исследованы свойства зрительного пигмента рецепторов миноги: оценены константа скорости спонтанной изомеризации и кинетика фотолиза. Впервые показана более высокая чувствительность «зеленых палочек» бесхвостых амфибий в сравнении с типичными палочками и определена обуславливающая ее особенность кинетики каскада фототрансдукции. Впервые подтверждено измерениями на изолированных клетках одного и

того же вида амфибий, что высокая стабильность их пигмента парадоксально сочетается с высокой скоростью фотолиза.

Значимость полученных соискателем результатов для науки и практической деятельности

Теоретическая и практическая значимость работы связана, в первую очередь, с углублением знаний о переходных процессах в эволюции зрительной системы. Используемый в данной работе подход – количественная характеристика параметров, определяющих чувствительность и кинетику ответа фоторецепторов, и их сравнение с типичными палочками и колбочками – могут помочь в определении ключевых перестроек и конкретных значений биохимических параметров, необходимых для функционирования клетки в роли рецептора ночного или дневного зрения. На основании проведенных исследований была успешно определена функциональная роль палочкоподобных рецепторов круглоротых и зеленых палочек бесхвостых амфибий.

Результаты, полученные в диссертации, могут быть включены в курсы лекций по ряду биологических дисциплин, в том числе по физиологии и биохимии. Подобные знания также могут быть полезны при разработке искусственных трансдукционных каскадов, направленных на протезирование утерянной зрительной функции оптогенетическими методами.

Структура и содержание работы

Диссертация построена по классическому образцу: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы из 285 источников. Работа изложена на 140 страницах и содержит 1 приложение, 38 рисунков и 4 таблицы.

Обзор литературы содержит информацию о современном состоянии науки в области изучения чувствительности и бысродействия палочек и колбочек.

В главах обзора литературы представлена информация о строении и электрическом ответе фоторецепторных клеток, структуре и свойствах зрительных пигментов, каскаде фототрансдукции и его основных реакциях. Достаточно подробно описаны функциональные переходы в эволюции фоторецепторов позвоночных. Рассмотрены гипотезы возникновения фоторецепторов переходного типа. Подробно представлена теория трансмутаций фоторецепторов. Отдельные подразделы посвящены описанию зеленых палочек амфибий и палочкоподобных рецепторов круглоротых. Показано, что короткие рецепторы миноги могут рассматриваться как фоторецепторы переходного типа, которые развились из типичных колбочек в параллельной челюстноротым эволюционной ветви, либо как сохранившиеся в почти неизменном виде архаичные клетки, сходные с неспециализированными фоторецепторами общего предка позвоночных.

Раздел **«Материалы и методы исследования»** содержит подробное описание объектов исследования и подготовки препаратов, предоставляет исчерпывающую информацию по дизайну проведенных экспериментов и методам, использовавшимся в работе, включая описание схем регистрации и анализа электрических ответов фоторецепторов, микроспектрофотометрии зрительных пигментов, статистической обработке данных.

В главе **«Результаты исследования и их обсуждения»** подробно изложены данные собственных исследований автора.

Автором описаны 6 этапов, потенциально вносящих существенный вклад в задержку фотоответа. Показано, что, вопреки текущим представлениям, средняя продолжительность цикла активации трансдуцина не имеет существенного влияния на задержку фотоответа. Вместо этого длительность задержки лимитируется более поздним этапом активации PDE.

Анализ фотоответов показал, что минимальная наблюдаемая задержка в колбочках очень мала и составляет 3-5 мс против 10-12 мс в типичных палочках. Задержка в переходных фоторецепторах – зеленых палочках лягушки и коротких рецепторах миноги – статистически не отличается от задержки в палочках и варьирует в пределах 10-15 мс. Таким образом, автор пришел к выводу, что кинетика начальных стадий активации каскада фототрансдукции, отвечающих за возникновение задержки в этих рецепторах соответствует палочковой.

Показано, что анализ чувствительности подтверждает переходный характер коротких фоторецепторов миноги, указывая на низкую эффективность их каскада фототрансдукции по сравнению с типичными палочками, несмотря на то, что благодаря малым размерам они способны регистрировать единичные фотоизомеризации в объеме наружного сегмента. Зеленые палочки лягушки, напротив, оказались даже более чувствительными детекторами одиночных квантов света, чем красные палочки, и потенциально способны совместно с ними обеспечивать сумеречное цветное зрение.

Для того, чтобы определить, какие процессы в каскаде фототрансдукции определяют обнаруженную разницу в чувствительности между типичными палочками, зелеными палочками лягушки и короткими рецепторами миноги, автором был проведен сравнительный анализ кинетики их фотоответов. В диссертации показано, что с учетом сдвига чувствительности, начальные участки ответов зеленых и красных палочек лягушки практически совпадают, в то время, как восходящая фаза ответа короткого рецептора миноги развивается примерно в 5 раз медленнее, чем у типичных палочек. Оценка кинетики нисходящей фазы фотоответа по постоянной времени экспоненциальной функции показала, что у зеленых палочек выключение каскада фототрансдукции происходит медленнее, чем у красных палочек, и, по-видимому, именно это различие обуславливает их повышенную чувствительность. Процессы выключения каскада в коротких фоторецепторах миноги, напротив, протекают быстрее, чем в типичных палочках, что совместно с замедленной активацией обеспечивает

сравнительно низкую абсолютную чувствительность. Таким образом, короткие рецепторы миноги представляют собой переходный по кинетике фототвиста тип фоторецептора. Эффективность процессов активации фототрансдукционного каскада у них соответствует типичным колбочкам, а кинетика выключения – палочкам.

Выявлена низкая стабильность пигмента миноги, что, как предполагает автор, связана с его промежуточной палочко-колбочковой природой, а не со сдвигом его чувствительности на 13 нм в длинноволновую область относительно родопсина лягушки. Пигмент зеленых палочек лягушки близок по стабильности к родопсину красных палочек, что соответствует результату Мэттьюза для пигмента жабы-аги. Результаты работы хорошо соответствуют экспериментам на пигментах *in vitro*, в которых было показано, что SWS2-пигменты бесхвостых амфибий имеют стабильность, близкую к палочковым родопсинам, что говорит об их стабилизации в ходе адаптации зеленых палочек к роли рецепторов ночного зрения.

Методом микроспектрофотометрии исследована кинетика фотолиза зрительных пигментов переходных фоторецепторов по сравнению с пигментами палочек и колбочек. Показано, что в интактных клетках зрительный пигмент зеленых палочек парадоксальным образом сочетает низкую склонность к спонтанным изомеризациям с высокой скоростью распада. Автором сделано предположение, что в наружном сегменте зеленой палочки присутствуют некие вспомогательные белки, ускоряющие процесс фотолиза. Физиологическая роль быстрого распада пигмента, возможно, является рудиментарным свойством, отражающим его колбочковое происхождение, однако не ограничивающее функционирование зеленых палочек в роли сверхспециализированных рецепторов ночного зрения.

Автор анализирует полученные результаты с привлечением широкого спектра данных литературы.

Выводы работы полностью обоснованы полученными результатами исследования.

Все результаты, представленные на защиту, получены либо лично диссертантом, либо при его непосредственном участии, что подтверждается опубликованными 5 статьями в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и апробацией результатов на 11 международных и российских конференциях.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации, изложен на 25 страницах, хорошо проиллюстрирован, отражает ее основные результаты, положения и выводы.

Замечания к работе

Принципиальных замечаний по сути работы нет, однако встречаются неточности оформления, грамматические ошибки, стилистически неудачные выражения.

После прочтения текста диссертации остаются следующие **вопросы**.

1. На стр. 20 указано, что «Палочки позвоночных в полной темноте генерируют случайные колебания тока – темновой шум, который состоит из двух компонентов, непрерывного и дискретного. Непрерывный шум состоит из симметричных колебаний низкой (десятые доли пикоампера) амплитуды, и, вероятно, связан со спонтанными колебаниями активности фосфодиэстеразы – эффекторного фермента в каскаде фототрансдукции». Что означает вся эта фраза?

2. В диссертации написано, что «По-видимому, быстрая активация PDE в колбочках связана с высокой эффективностью взаимодействия их молекул трансдуцина и PDE и пока неясно, какие особенности их структуры и/или упаковки в фоторецепторной мембране могут обеспечить такую эффективность». Какие бы факторы Вы бы выделили как наиболее значимые: упаковка в мембране, структурные особенности PDE колбочек, эффект локального «стерического зажатия», мультимерные надмолекулярные комплексы или что-то еще?

Заключение

По совокупности полученных результатов диссертация, представленная Александром Юрьевичем Ротовым, являет собой завершенное, систематическое и важное научное исследование. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключение обоснованы. Замечания и вопросы не влияют на общую высокую значимость работы.

Диссертация Александра Юрьевича Ротова на тему «Чувствительность и быстрое действие палочек и колбочек: эволюционный аспект», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - «Физиология человека и животных» - является законченной научно-квалификационной работой и содержит новые научные результаты и положения, совокупность которых можно классифицировать как новое решение задачи в области исследований фоторецепторов переходного типа.

Диссертация Александра Юрьевича Ротова «Чувствительность и быстрое действие палочек и колбочек: эволюционный аспект», по содержанию, актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований и значению данных, соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» ВАК Республики Армения и предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - «Физиология человека и животных».

Отзыв на диссертацию и автореферат составлен д.м.н., профессором, научным руководителем научного отдела физиологии сенсорных систем ИФ РАН Ю.Е. Шелепиным.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории физиологии зрения ИФ РАН (протокол N 3 от «01» июня 2026 года).

Научный руководитель научного отдела физиологии сенсорных систем
Института физиологии им И.П. Павлова РАН
Доктор медицинских наук, профессор



Шелепин Юрий Евгеньевич

199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6.

тел. (812) 328-11-01, факс (812) 328-05-01, e-mail:
Pavlov.institute@infran.ru

