

ОТЗЫВ

Оппонента на диссертационную работу

Ротова Александра Юрьевича

на тему:

«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»

Диссертационная работа Ротова Александра Юрьевича посвящена актуальной проблеме сравнительной и эволюционной физиологии зрения - выявлению функциональных и биохимических признаков, определяющих принадлежность фоторецептора к системе дневного или ночного зрения. Классическое разделение фоторецепторов на палочки и колбочки, первоначально основанное преимущественно на морфологических критериях, оказалось недостаточным для описания клеток с промежуточными свойствами. В этой связи количественное сопоставление чувствительности, кинетики фотоответа и свойств зрительных пигментов у типичных и переходных фоторецепторов имеет принципиальное значение для понимания механизмов адаптивной эволюции зрительной системы позвоночных. Выбранная автором тема является современной и несомненно актуальной.

Цель исследования сформулирована как оценка основных параметров каскада фототрансдукции, определяющих чувствительность и кинетику ответов на свет типичных палочек и колбочек позвоночных, в сравнении с двумя типами переходных фоторецепторов - палочкоподобными короткими рецепторами речной миноги (*Lampetra fluviatilis*) и зелеными палочками озерной лягушки (*Pelophylax ridibundus*), - с последующим уточнением их функциональной роли. Для достижения цели автор последовательно решает четыре взаимосвязанные задачи: определяет происхождение начальной задержки фотоответа; сопоставляет чувствительность и кинетические параметры ответов; оценивает скорость фотолиза зрительных пигментов; анализирует частоту их спонтанной активации. Логика исследования выдержана: от анализа отдельных стадий сигнального каскада автор переходит к интегральной функциональной характеристике изучаемых клеток и далее - к обсуждению их возможного эволюционного происхождения.

Научная новизна работы не вызывает сомнений. Автором показано, что длительность начальной задержки электрического ответа фоторецептора определяется не циклом активации трансдуцина зрительным пигментом, как предполагалось ранее, а более поздним этапом связывания фосфодиэстеразы с активированным трансдуцином. Установлено, что скорость данного процесса в колбочках примерно на порядок выше, чем в палочках. Впервые проведено количественное сравнение минимальной задержки фотоответа у типичных и переходных

фоторецепторов, а также получены новые данные о чувствительности и кинетике коротких рецепторов миноги и зеленых палочек лягушки.

Особый интерес представляют результаты, характеризующие зеленые палочки бесхвостых амфибий как высокоспециализированные рецепторы ночного зрения. Их повышенная по сравнению с типичными красными палочками чувствительность связана прежде всего с замедлением процессов выключения каскада фототрансдукции и увеличением времени интегрирования фотоответа. Одновременно показано необычное сочетание высокой частоты спонтанных изомеризаций SWS2-пигмента зеленых палочек с высокой, типично колбочковой скоростью его фотолиза. Этот результат разрешает существовавшие в литературе противоречия о темновой стабильности пигмента, и вместе с тем ставит новый вопрос о молекулярных механизмах взаимодействия ретиналя с опсином в интактной клетке.

Не менее значимы данные о коротких рецепторах речной миноги. Автор демонстрирует, что функционально они являются рецепторами ночного зрения и способны регистрировать одиночные фотоизомеризации, однако сохраняют комплекс промежуточных палочко-колбочковых признаков. Низкая по сравнению с типичными палочками абсолютная чувствительность определяется сочетанием менее эффективной активации каскада с его более быстрым выключением. Зрительный пигмент коротких рецепторов миноги также занимает промежуточное положение между типично палочковыми и колбочковыми пигментами по стабильности и скорости фотолиза. Совокупность этих данных существенно уточняет представления о функциональной дифференцировке фоторецепторов у ранних позвоночных.

Теоретическая значимость исследования определяется выявлением конкретных стадий фототрансдукционного каскада, обеспечивающих различия между палочками и колбочками, и развитием функционального подхода к классификации переходных фоторецепторов. Результаты важны для эволюционной физиологии, физиологии сенсорных систем и нейробиологии зрения. Практическая перспектива связана с возможностью учета установленных принципов внутриклеточной сигнализации при разработке искусственных трансдукционных каскадов и оптогенетических подходов к протезированию зрительной функции.

Экспериментальная часть выполнена на адекватном наборе сравнительных объектов: зеленых и красных палочках озерной лягушки, коротких рецепторах речной миноги, красночувствительных колбочках серебряного карася и, в отдельных сериях, палочках стерляди. Применен комплекс взаимодополняющих методов: регистрация тока одиночных фоторецепторов, электроретинография изолированной сетчатки, скоростная дихроичная микроспектрофотометрия, математическое моделирование, анализ дискретного темнового

шума и кинетики фотолиза. Условия регистрации, калибровка стимулов и обработка сигналов описаны подробно.

Статистическая обработка включает проверку нормальности распределений, оценку однородности дисперсий, применение параметрических и непараметрических методов с соответствующими *post hoc* сравнениями и поправками на множественные сопоставления. Экспериментальные данные представлены наглядно; рисунки, таблицы и математическое приложение содержательно дополняют текст. Выводы сформулированы последовательно, соответствуют поставленным задачам и основаны на полученных результатах. В целом достоверность основных положений диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертация изложена на 140 страницах и включает список использованных сокращений, введение, обзор литературы, главу «Материалы и методы», главу с результатами исследования, отдельную главу обсуждения, заключение, шесть выводов, список цитируемой литературы из 285 источников и приложение с математической моделью фотоответа. Работа проиллюстрирована 38 рисунками и содержит 4 таблицы.

В обзоре литературы систематизированы современные представления о строении фоторецепторов, свойствах зрительных пигментов, механизмах активации и выключения каскада фототрансдукции, природе начальной задержки фотоответа и функциональных переходах фоторецепторов в эволюции позвоночных. Особое внимание уделено зеленым палочкам амфибий и палочкоподобным рецепторам круглоротых. Обзор непосредственно подводит к формулировке цели и задач и создает необходимую основу для интерпретации собственных результатов.

В главе «Материалы и методы» детально описаны подготовка препаратов, регистрация электрических ответов, анализ кинетики фототрансдукции и темнового шума, микроспектрофотометрия и статистическая обработка. В главе 3 представлены результаты анализа свойств пигментов, задержки фотоответа, чувствительности и кинетики переходных фоторецепторов. В главе 4 данные сопоставлены с современными представлениями о фототрансдукции и рассмотрены в эволюционном контексте. Обсуждение носит аналитический характер и не сводится к повторению результатов.

Основные результаты прошли достаточную апробацию. По теме диссертации опубликовано 17 работ: 5 статей в журналах, индексируемых международными базами данных, и 12 тезисов конференций. Результаты представлены на российских и международных научных форумах. Личный вклад соискателя включает планирование и проведение экспериментов, анализ и статистическую обработку данных, а также подготовку публикаций.

Вопросы и замечания:

1. В таблицах и подписях к рисункам величина n преимущественно обозначает число исследованных клеток. Для полной оценки независимости наблюдений желательно дополнительно указать число животных и число независимых препаратов, из которых получены клетки в каждой экспериментальной серии, а также пояснить, учитывалась ли при статистическом анализе учитывалась внутригрупповая зависимость измерений, выполненных на клетках одного животного.
2. При обсуждении происхождения коротких рецепторов многи автор справедливо рассматривает два сценария: незавершенную трансмутацию колбочек и сохранение архаичных признаков предкового неспециализированного фоторецептора. Было бы полезно более четко обозначить, какие молекулярные, филогенетические или сравнительно-физиологические данные в дальнейшем позволили бы разграничить эти гипотезы. Данное замечание имеет дискуссионный характер и не снижает ценности полученных результатов.

Высказанные вопросы не затрагивают обоснованность основных результатов и выводов и могут рассматриваться как направления дальнейшего развития исследования.

В целом диссертация Ротова Александра Юрьевича «Чувствительность и быстрое действие палочек и колбочек: эволюционный аспект» является завершенной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена значимая для физиологии сенсорных систем задача установления физиологических и биохимических характеристик, определяющих функциональный тип фоторецептора. Работа соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Республики Армения к кандидатским диссертациям, а автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.09 - «Физиология человека и животных».

Оппонент: Карпенко Марина Николаевна, доктор биологических наук,
заведующий Лабораторией нейрехимии Физиологического отдела им. И. П. Павлова
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт
экспериментальной медицины»,
197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова 12Д.
e-mail: kaprenko.mn@iemspb.ru
тел.: +7(921)6534852

