

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

Кандидата биологических наук, руководителя группы «Биофотоника» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН – Никитина Евгения Сергеевича - о диссертации Хазиева Эдуарда Фаритовича «Изменение кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании под действием холинергических агентов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика (биологические науки).

Структура и объем диссертации.

Текст диссертации включает в себя введение, формулировки положений, выносимых на защиту, обзор литературы, описание методов исследования, основной главы с изложением результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (243 ссылки). Работа содержит 41 рисунок и одну таблицу. Объем работы составляет 130 стр.

Актуальность работы.

Основным запускающим механизмом, следующим за приходом нервного импульса, во всех возбудимых клетках является вход ионов кальция в пресинаптическую клетку. Таким образом, изучение кальциевого метаболизма с применением современных биофизических подходов, несомненно, является актуальной задачей нейрофизиологии. Ацетилхолин является нейромедиатором, опосредующим передачу импульсов в периферических синапсах как теплокровных так и холоднокровных животных. Исследование процесса модуляции синаптической передачи ацетилхолином за счет активации

пресинаптических холинорецепторов является важным звеном в нашем понимании общих механизмов синаптической передачи и синаптической пластичности, и также потенциально может подсказать новые подходы к разработке и тестированию нейрофармакологических агентов - потенциальных лекарственных препаратов для лечения мышечных и неврологических патологий. С этой точки зрения данные полученные в настоящем исследовании, несомненно, представляют собой большой интерес как для ученых, изучающих молекулярные основы работы синаптического аппарата, так и имеют прикладное значение и должны учитываться при разработке новых препаратов применяемых для лечения нервных патологий.

Обзор литературы.

Обзор литературы составляет примерно половину работы, и состоит из 7-ми частей, посвященных: 1) холинергической передаче, 2) роли кальция в синаптической передаче, 3) потенциал-зависимым кальциевым каналам, 4) роли пресинаптических рецепторов нейромедиатора в регуляции высвобождения, 5) метаботропным рецепторам, 6) ионотропным рецепторам, и 7) методам регистрации кальциевого сигнала. Обзор посвящен анализу современных и классических работ по указанным темам и может быть использован в ВУЗах в лекционных курсах по нейрофармакологии и физиологии синаптической передачи.

Методические подходы.

Основной используемый в работе метод визуализации кальциевого сигнала относится к инновационным и дорогостоящим, применение которого было осложнено тем, что он постоянно сочетался с фармакологией и аппликацией нейроактивных веществ. Несмотря на это, автор довел реализацию метода практически до совершенства, и с его помощью провел массивные

нейрофармакологические эксперименты с последовательным предъявлением огромного числа блокаторов и агонистов, позволившие вычленить и описать конкретные механизмы, лежащие в основе пресинаптической регуляции ацетилхолиновой синаптической передачи. Представленные в диссертационной работе исследования находятся на самом высоком современном уровне, а методический инструментарий полностью соответствует поставленным задачам.

Удачным является выбор нервно-мышечного соединения лягушки в качестве модели исследования, являющегося классическим объектом, доказавшим свою значимость для изучения механизмов синаптической передачи. Кроме того, нервно-мышечное соединение достаточно хорошо изучено, что создает литературный базис из предыдущих работ и позволяет точно выбирать адекватные нейрофармакологические агенты и методы экспериментальных воздействий, а также соотносить свои исследования с широким контекстом других работ на этой модели.

Результаты исследований и обсуждение.

Описание и обсуждению экспериментальных данных посвящены 15 подразделов основной части диссертации (глава 4), последовательно отображающих ход исследований, начиная с предварительных экспериментов, показывающих справедливость выбранных методов и применения визуализации свободного внутриклеточного кальция в пресинаптической терминали (первые 4 подраздела), и продолжая последовательными фармакологическими экспериментами, выявляющими роль ацетилхолина и его агонистов в авторегуляции ацетилхолиновой передачи (остальные 11 подразделов).

В начале главы автор скрупулёзно разбирает механизмы формирования «кальциевого транзиента» исследуя фармакологические свойства красителя и связывая его амплитуду с содержанием кальция во внеклеточной среде.

Далее автор последовательно показывает влияние присутствия холиномиметиков на токи концевой пластинки и связывает его эффект с

изменениями в динамике входа внутриклеточного кальция в терминали. В ходе экспериментов автор также устанавливает специфичность действия применяемых холиномиметиков, проводя различные контроли. Далее, используя в качестве холиномиметиков карбахолин и никотин, автор проводит подробный анализ наблюдаемого эффекта угнетения кальциевого сигнала в терминали, с помощью букета различных специфических блокаторов последовательно выясняя, какие именно типы ацетилхолиновых рецепторов и кальциевых каналов стоят за наблюдаемыми явлениями пресинаптической авторегуляции. В ходе исследования автор также исключает влияние выброса кальция из эндоплазматического ретикулума на пресинаптические эффекты холиномиметиков. Для выяснения физиологического значения наблюдаемых феноменов автор подобрал экспериментальные условия, при которых сумел выяснить возможное участие эндогенного ацетилхолина в регуляции входа кальция в нервное окончание. Для этого был проведен блок экспериментов с применением блокаторов никотиновых и мускариновых рецепторов и серия опытов с блокадой фермента – ацетилхолинэстеразы. В последних экспериментах создавались условия накопления эндогенного ацетилхолина и выяснение его роли в регуляции кальциевого транзientа. Так же физиологическая значимость наблюдаемых эффектов холиномиметиков была подкреплена данными, полученными традиционными электрофизиологическими методами. По полученным данным автор делает заключения высокой степени достоверности о том, что эндогенный ацетилхолин, выделяющийся в синаптическую щель во время стимуляции двигательного нерва в физиологических условиях, участвует в регуляции входа кальция и регулирует выброс квантов медиатора по принципу обратной отрицательной связи.

Заключение.

Существенных замечаний по работе нет, и имеется лишь несколько вопросов уточняющего характера.

1) Стр 60: «Количественное представление изменения интенсивности флуоресцентного сигнала выражали через отношение относительного изменения флуоресценции к базовому свечению $\Delta F/F_0$ ». Насколько величина F_0 варьировала от препарата к препарату? Каким образом обеспечивалась воспроизводимость окрашивания препаратов в разных экспериментах?

2) Стр 61: «В каждом эксперименте проводили усреднение 60 флуоресцентных ответов в контроле и после действия исследуемых веществ». Насколько величина F_0 изменялась в длительном эксперименте после многократной стимуляции?

3) Стр. 67: «Задний фронт сигнала определяется процессом диссоциации красителя с ионами кальция» Чем определяется передний фронт и имеется ли отставание пика «транзиента» от электрического сигнала? Насколько хорошо воспроизводится амплитуда «транзиента» в ответ на повторяющиеся потенциалы действия?

4) В работе показана отрицательная обратная связь, регулирующая возбудимость нервного окончания через пресинаптические ауторецепторы. Насколько значителен или незначителен прямой вклад Ca^{2+} - чувствительных потенциал-зависимых калиевых каналов (чувствительных к ибериотоксину), обнаруженных в т.ч. и на пресинаптической мембране нервно-мышечного соединения лягушки (Robitaille и др. 1993)? Каким образом исключалось влияние $K(Ca)$ каналов на полученные результаты?

В диссертации присутствуют незначительные недочеты по оформлению и стилистике изложения, которые, однако, не умаляют высокого качества проделанной работы. Автор вводит термин «транзиент», многократно употребляемый в работе. Примечательно, что в гл. 4.2., где, по-видимому, дается определение термина «транзиент» как кальциевого сигнала, вызванного потенциалами действия, отсутствует упоминание о самом «транзиенте» как таковом. Однако, далее без каких либо переходов автор начинает употреблять этот термин, замещая «транзиентом» другие синонимы, такие как « Ca^{2+} -сигнал»,

«кальциевый сигнал», и «Ca²⁺-ответ». Кроме того, в работе отсутствует явное сопоставление одновременно зарегистрированных флуоресцентного сигнала («транзиента») с вызывающим его электрофизиологическим сигналом – приводятся только изображения флуоресцентных записей. Такое сопоставление могло быть очень выигрышным для иллюстрации соответствия метода поставленной задаче, поскольку методика регистрации кальциевого сигнала в данной работе является основным экспериментальным методом.

В изложении также присутствуют другие необычные слова и выражения. Например, автор почему-то везде использует слова «загруженный», «загрузка», заменяя на них всё связанное с окрашиванием биологических объектов вне зависимости от контекста. Имеется ошибка цитирования на стр. «После входа через потенциал-зависимые кальциевые каналы, 95% ионов Ca²⁺ связывается с участками связывания, расположенными на расстоянии 10-50 нм от места входа (Neher, 1995)». В этой работе такого нет, это цитата из более поздней работы с участием Неера – статья Gabso и др. (1997) в Neuron v. 18 p 473-81.

Диссертация на тему «Изменение кальциевого транзиента в двигательном нервном окончании под действием холинергических агентов» полностью соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Хазиев Эдуард Фаритович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – Биофизика (биологические науки).



Никитин Никитин Евгений Сергеевич, к. б. н., с. н. с.,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН, д. 5А, ул. Бутлерова, Москва 117485, (495) 334-70-00, nikitin@ihna.ru

Сотзаков Создаем ознакомлен
03.06.2015 *Зарин*

Никитин Е. С.
УДОСТОВЕРЯЮ
Зам. канц. ИВНД и НФ

Сотзаков