

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Хазиева Эдуарда Фаритовича

«Изменение кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании под действием холинергических агентов»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика

Главной проблемой нейробиологии является изучение процесса передачи информации в живых системах. Основным звеном передачи информационных сигналов в как центральной так и в периферической нервных системах является химический синапс. Именно синапс является структурной единицей подверженной пластическим перестройкам в процессе развития и жизнедеятельности организма. Такие фундаментальные процессы - как формирование памяти и обучения также связаны с молекулярными изменениями на уровне синаптических контактов. Мишенью для ряда нейродегенеративных заболеваний так же является синаптическая передача. Изучение процессов передачи нервных импульсов в синапсах и процессов саморегуляции в этих системах, несомненно, является актуальной проблемой нейробиологии. Одной из традиционных моделей для изучения синаптической передачи является нервно-мышечный синапс.

Несмотря на обширный экспериментальный материал, собранный за годы изучения мионевральной передачи многие аспекты работы этого синаптического контакта остаются до сих пор не изученными. Применение современных биофизических подходов для изучения этой удобной экспериментальной модели может существенно расширить наши знания о молекулярных основах функционирования синаптического аппарата. Основным запускающим звеном в процессе передачи сигнала в любом химическом синапсе является вход кальция во время распространяющегося потенциала действия. Изучение кальциевого метаболизма и его модуляции при различных физиологических состояниях синапса несомненно является важным аспектом решения многих фундаментальных задач нейробиологии. Современные методические подходы позволяют детально изучать все этапы работы синапса от прихода нервного импульса до выброса

синаптических везикул. Применение флуоресцентных красителей в совокупности с современными методиками регистрации быстрых оптических сигналов позволяют детально оценивать изменение пресинаптического уровня кальция в периферических синапсах.

Диссертационная работа Хазиева Эдуарда Фаритовича посвящена изучению роли ионов кальция в реализации ауторегуляции выброса медиатора на примере холинергического синапса. Использование в качестве модели нервно-мышечное соединение и, применяемые в работе современные биофизические методы исследований, позволяют подтвердить полное соответствие диссертационной работы заявленной специальности – 03.01.02-биофизика. Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики РАН, для которой проблема надежности синаптической передачи является одним из ключевых направлений на протяжении многих лет. Сохранение научной преемственности подготовило прочную основу для диссертации Хазиева Э.Ф. Автор при обсуждении собственных данных опирается на результаты, полученные ранее коллективом лаборатории, что позволяет провести более глубокий анализ и делает работу целостной.

Диссертационная работа имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованных сокращений и списка цитированной литературы.

Во введении автором убедительно и аргументировано обоснована актуальность проблемы и поставлен основной вопрос – какую роль изменение пресинаптического уровня кальция играет в процессе ауторегуляции секреции квантов медиатора.

В обзоре литературы (раздел 2) представлен анализ имеющихся на сегодняшний день данных литературы по теме исследования на основании более 200 источников. Обзор литературы имеет аналитический характер, написан хорошим языком и логично структурирован.

Раздел 3 дает представление о методах, использованных при выполнении работы: флуоресцентном и электрофизиологическом. Подробно описаны - регистрация и обработка флуоресцентных сигналов. Отдельно необходимо

подчеркнуть используемую методику оценки пресинаптического уровня кальция в нервном окончании при помощи флуоресцентного красителя. Несмотря на то, что этот метод уже давно используется для изучения синапсов центральной нервной системы, применение его на периферических синапсах сопряжено с определенными методическими трудностями, с которыми автор работы сумел с успехом справиться. Одной из таких сложных экспериментальных задач, была загрузка красителя в нервное окончание. Автор применил интересное решение этой проблемы - загрузку красителя через культю нерва. Несомненно, важное значение при выборе такой методики загрузки является подбор подходящего препарата, который переживает длительную инкубацию. Этому условию отвечает выбранный объект исследования - нервно-мышечное соединение лягушки. Важной задачей был выбор подходящей регистрирующей аппаратуры, которая позволяла бы с достаточным временным и амплитудным разрешением регистрировать быстрые кальциевые сигналы. С этой задачей автор так же с успехом справился, используя быстродействующий фотодиод.

В четвертом разделе диссертации изложены основные результаты, полученные автором, и проведено их обсуждение. Экспериментальный материал разнообразен и хорошо систематизирован. Каждый подраздел содержит промежуточные выводы и логично поставленные задачи для последующих серий экспериментов. В разделе 4.1 проведена оценка влияния загрузки красителя на параметры квантовой секреции и показана валидность применяемой методики регистрации относительного изменения концентрации кальция. В разделах 4.2-4.4 дано описание зарегистрированного сигнала и показано, что он отражает динамику входящего в нервное окончание кальция во время потенциала действия через потенциал-зависимые кальциевые каналы. Разделы 4.5 и 4.6 посвящены изучению влияния ацетилхолина и карбахолина на квантовый состав токов концевой пластинки и на кальциевый транзист, где показано наличие холинергической модуляции процесса выделения медиатора посредством изменения входа кальция в моторное нервное окончание. В разделах 4.7-4.11 проводится анализ рецепторных путей реализации регуляции входа кальция в нервное окончание. Показано, что холинергические агенты модулируют вход кальция в пресинапс посредством активации мускариновых рецепторов M_2 -подтипа и д-тубокурарин-чувствительных

никотиновых рецепторов. В разделе 4.12 показано, что в реализации действия карбахолина на пресинаптический уровень кальция участвуют кальциевые каналы N-типа. Проверка гипотезы об участии эндоплазматического ретикула описана в разделе 4.13. Важные с точки зрения физиологической значимости результаты изложены в разделе 4.14, где показано, что эндогенный ацетилхолин, выделяющийся в синаптическую щель, действует угнетающе на вход кальция в нервное окончание. В разделе 4.15 приведены результаты электрофизиологического эксперимента, в ходе которого исследовалось влияние блокады M_2 -рецепторов на интенсивность квантовой секреции ацетилхолина при высокочастотной стимуляции.

Итоги экспериментальной части диссертационной работы подведены в заключении, где суммированы полученные в работе данные.

Завершают диссертацию семь выводов, в которых отражена теоретическая значимость исследования. Выводы диссертации, как и положение, выносимое на защиту, корректно сформулированы автором исключительно на основании результатов, полученных в работе; они вполне согласуются с задачами, стоявшими перед диссертантом, и основаны на результатах большого числа проведённых экспериментов.

Следует специально подчеркнуть, что все главы диссертации написаны чётко, логично и хорошим языком. Описание результатов исследования сопровождаются хорошие фотографии и аккуратно выполненные рисунки, что позволяет по заслугам оценить качество работы.

Давая в целом положительную оценку полученным результатам и сделанным выводам, хотел бы остановиться на некоторых моментах, которые мне представляются не вполне убедительными.

1. Объяснить применение слова транзист
2. Какова кинетика спада внутриклеточной концентрации ионов Ca . За какое время флуоресцентный сигнал спадал до исходного уровня.
3. Эффекты холиномиметиков в различных участках терминали и в терминалях с различными исходными величинами флуоресцентных сигналов.
4. Почему не использовали мембранопроникающие красители.

5. Каков молекулярный механизм связи пресинаптического холинорецептора с Ca-каналом.

6. Как Вы объясняете увеличение облегчения и уменьшение депрессии при высокочастотном раздражении на фоне блокады M2 рецепторов с учетом известной динамики внутриклеточной концентрации ионов Ca при высокочастотной активности и роли остаточного Ca

В работе присутствует незначительное количество опечаток и неточностей в оформлении списка литературы.

В целом, следует отметить, что высказанные замечания никоим образом не влияют на общую высокую ценность представленной к защите диссертации и на ее результаты и выводы. Диссертационная работа Э.Ф. Хазиева в целом заслуживает высокой положительной оценки. Критические комментарии вызваны интересом к представленным результатам.

Проведенный автором анализ вносит существенный экспериментальный и теоретический вклад в понимание механизма ауторегуляции синаптической передачи возбуждения.

Содержание автореферата и сделанных по работе публикаций полностью отражают основные положения диссертации. Заключение и выводы работы соответствуют цели и задачам проводившихся исследований, адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений. При написании диссертации Хазиев Э.Ф. корректно использовал ссылки на литературу при привлечении для обсуждения результатов, полученных другими авторами. Материалы диссертационной работы Хазиева Э.Ф. были представлены на ряде конференций, в том числе международных. Полученные в работе результаты могут быть полезны ученым занимающимся изучением нервно-мышечной передачи, а также могут использоваться в лекционных курсах для студентов, обучающихся в университетах по специальностям биофизика и физиология человека и животных.

Считаю, что объем, актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы, ее теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа Хазиева Эдуарда Фаритовича «Изменение кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании под действием холинергических агентов», выполненная под руководством к.б.н.

Самигуллина Дмитрий Владимировича соответствует паспорту специальности 03.01.02 – биофизика и квалификационным требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает искомой степени по специальности 03.01.02 биофизика.

Зефиров Андрей Львович

Чл.-корр. РАН, Доктор медицинских наук, профессор,

Заведующий кафедрой нормальной физиологии

Казанского государственного медицинского университета

420012 г. Казань, ул. Бутлерова, д.49

zefiroval@rambler.ru

+7(843)292-72-99; 292-73-89



А. Л. Зефиров

Подпись <u>проф. А. Л. Зефирова</u>	заверяю.
Ученый секретарь Ученого Совета ГБОУ ВПО Казанский ГМУ	
доцент <u>Радченко О.Р.</u>	Радченко О.Р.
« 02 » <u>июня</u>	20 <u>15</u> г.

Подпись <u>Зефирова А. Л.</u>	удостоверяю.
Специалист по кадрам	
« _____ » _____	20 _____ г.

С отзывом ознакомлен 03.06.2015