

УТВЕРЖДАЮ:

ВРИО директора ИЭФБ РАН

академик Веселкин Н.П.

2015 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской
академии наук 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

Актуальность темы диссертационного исследования. Молекулярные механизмы процесса нейросекреции и способы ее модуляции являются одной из наиболее значимых проблем нейробиологии. Казанская нейрофизиологическая школа имеет многолетние традиции в области изучения процесса синаптической передачи возбуждения в нервно-мышечном синапсе. В последние годы за счет применения современных биофизических подходов появилась возможность исследовать тонкие процессы регуляции машины экзоцитоза, как в синапсах центральной нервной системы, так и в периферических синапсах на качественно новом уровне. Оригинальность работы Хазиева Эдуарда Фаритовича состоит в том, классические электрофизиологические регистрации дополнены использованием метода флуоресцентной оценки пресинаптического уровня концентрации ионов кальция при помощи специализированного красителя. Это позволило диссертанту напрямую исследовать воздействие различных модуляторов на кальциевый метаболизм в пресинаптическом окончании. Применение современного подхода дало возможность взглянуть по-новому на результаты исследований, полученные ранее в лаборатории, на базе которой выполнялась работа диссертанта.

Были получены результаты, свидетельствующие о том что, эффекты холиномиметиков связаны с изменением входа кальция в пресинаптическое нервное окончание. Обнаружен механизм ауторегуляции выброса квантов ацетилхолина из двигательного нервного окончания, функционирующий по принципу отрицательной обратной связи. Большой интерес представляют полученные автором экспериментальные данные по исследованию влияния эндогенного ацетилхолина на параметры кальциевого транзientа. Они свидетельствуют о том, что в нормальных физиологических условиях процесс выброса

медиатора является предметом аутоингибирования через систему никотиновых и мускариновых рецепторов.

Таким образом, данная работа заполняет существенный пробел в современных представлениях о механизмах регуляции синаптической передачи, что является актуальной проблемой не только для физиологии периферических синапсов, но и для синаптической передачи в ЦНС, где подобного рода эффекты лежат в основе важнейшего явления синаптической пластичности. Полученные результаты могут быть также полезны при разработке новых лекарственных препаратов, поскольку синаптические дефекты, лежащие в основе многих нейродегенеративных заболеваний, связаны с нарушением нервно-мышечной передачи.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

Научное положение рецензируемой работы сформулировано диссертантом на основе результатов, полученных с помощью современного флуоресцентного метода исследования динамики кальция, а также классического и хорошо зарекомендовавшего себя электрофизиологического метода регистрации синаптических ответов. Использование классического объекта для изучения синаптической передачи – нервно-мышечного соединения лягушки – позволило получить объективные данные, раскрывающие механизм ауторегуляции выброса медиатора, устроенный по принципу отрицательной обратной связи. Эксперименты проводились в строго стандартных условиях и с соблюдением правил работы с лабораторными животными, что минимизировало возможность случайных погрешностей при получении первичных данных. Весь комплекс лабораторного оборудования полностью соответствовал решению поставленных задач. Используемые методы позволили Хазиеву Э.Ф. получить достоверные и убедительные данные. На основе результатов статистического анализа материалов исследования адекватными математическими методами автором обоснованно сформулировано основное научное положение диссертационной работы. Выводы диссертации объективно отражают ее основное положение, следуют из сущности результатов исследования и являются полностью обоснованными.

Научная новизна работы и достоверность полученных результатов. В работе впервые произведен подробный анализ изменения кальциевого транзientа, отражающего вход кальция в пресинаптическое окончание, при активации и блокаде холинорецепторов различными холинергическими агентами. Показано, что активация рецепторов как

неспецифичными агентами (карбахолин, ацетилхолин), так и агонистами специфического действия (мускарин, никотин), снижает пресинаптический уровень кальция в нервном окончании.

В работе проанализирована роль потенциал-управляемых кальциевых каналов N-типа и каналов эндоплазматического ретикулума в формировании пресинаптического уровня кальция. Впервые было показано, что блокада мускариновых и никотиновых рецепторов приводит к увеличению кальциевого транзientа. Также впервые показано уменьшение кальциевого транзientа в условиях накопления эндогенного ацетилхолина при блокаде холинэстеразы прозеринном. Эти данные вместе с результатами, полученными электрофизиологическими методами, позволили выявить роль эндогенного ацетилхолина в регуляции входа кальция и в целом в системе ауторегуляции выброса медиатора.

Основные результаты диссертации опубликованы в 20 научных трудах, в том числе в трех журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций основных положений диссертации. Материалы диссертации неоднократно докладывались на Международных, Всероссийских конференциях и съездах. Представленные для защиты материалы действительно являются оригинальными и представляют несомненный теоретический и практический интерес.

Личный вклад соискателя в разработке научного направления подтверждается списком опубликованных научных работ по теме диссертации, представленных в различных изданиях, в том числе – в рецензируемых и рекомендованных ВАК. Обстоятельность и аккуратность изложения результатов собственных исследований, знакомство с первичным материалом опытов объективно свидетельствует о том, что автор владеет всеми деталями биофизических экспериментов и полностью компетентен в вопросах организации и проведения собственной работы.

Оценка объема, структуры и содержания работы. Диссертация объемом 130 страниц состоит из введения, обзора литературы, изложения объектов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы включает 243 источника, из них 16 отечественных и 227 иностранных авторов. Диссертация содержит 41 рисунок и 1 таблицу. Объем рукописи представляется оптимальным, а автореферат полностью отражает содержание диссертации.

В разделе «Введение» отражены актуальность и значимость исследования, обосновывается выбор темы исследования, корректно сформулированы цель и задачи, научная новизна и практическая значимость работы, а также положение, выносимое на

защиту.

Во втором разделе диссертации "Обзор литературы" дан анализ состояния изучаемой проблемы, рассмотрена роль ионов кальция в синаптической передаче, дана информация о представленных на пресинаптическом окончании рецепторах и их подтипах. Пристальное внимание уделено описанию методики оценки пресинаптического уровня кальция.

Третий раздел посвящен описанию объекта и методов исследования. Используемые в работе метод оптической регистрации кальциевых ответов и электрофизиологические внутриклеточная и экстраклеточная микроэлектродные техники являются наиболее адекватными методами для сопоставления динамики пресинаптического кальция и секреции медиатора. В целом, используемые методы соответствуют поставленной цели и задачам. Методы и обоснование их использования описаны достаточно подробно, что выделяет данную работу в положительную сторону.

Раздел «Результаты исследований и обсуждение» состоит из нескольких частей, посвященных исследованию механизма, ответственного за осуществление ауторегуляции выброса медиатора посредством изменения динамики входа кальция в нервное окончание.

Показана связь уменьшения кальциевого транзientа и квантового состава под действием холинергических агентов – ацетилхолина и его негидролизуемого аналога карбахолина. Хазиев Э.Ф., используя фармакологический подход, показал участие M₂-подтипа мускариновых и д-тубокурарин-чувствительных никотиновых холинорецепторов в реализации угнетающего действия холиномиметиков. Показано, что активация этих рецепторов приводит к изменению входа кальция по двум путям: посредством воздействия на потенциал-чувствительные кальциевые каналы через G-белки, связанные с мускариновыми рецепторами, или же путем изменения электрогенеза за счет модуляции длительности потенциала действия при активации никотиновых рецепторов.

В разделе «Заключение» подробно проанализированы полученные результаты с привлечением современных литературных источников. Полученные данные позволяют описать конкретный механизм ауторегуляции секреции медиатора посредством изменения пресинаптического входа ионов кальция. Этот результат представляет ценность не только для фундаментальной науки, но также несет практическую значимость, проясняя пресинаптическое действие миорелаксантов деполяризующего типа.

Вопросы и замечания. Несмотря на высокий в целом уровень работы, нельзя не высказать ряд вопросов и замечаний.

1. Обзор литературы в диссертации слабо проиллюстрирован. Описание достаточно

сложных сигнальных путей и каскадов должно бы сопровождаться иллюстрациями. Без них чтение обзора литературы представляет известные затруднения и снижает полезность этого раздела для широкого круга читателей.

2. На стр. 71 сказано, что «Добавление карбахолина в концентрации 10 мкМ приводило к снижению амплитуды мТКП и ТКП на $26 \pm 5\%$ ($n=4$, $P < 0.05$) и $61 \pm 8\%$ ($n=4$, $P < 0.05$), соответственно.» Снижение амплитуды ТКП естественно может вызываться уменьшением квантового состава. Однако, уменьшение амплитуды мТКП является надежным признаком постсинаптического действия. Хотелось бы узнать, какой может быть механизм этого эффекта.
3. Поскольку ацетилхолин и его аналоги воздействуют на постсинаптическую мембрану, можно предположить возможность ретроградного влияния на пресинаптическое окончание. Как автор оценивает такую возможность?
4. В работе четко показано, что активация в пресинаптическом окончании как мускариновых так и никотиновых холинорецепторов влияет на выброс медиатора. Для мускариновых рецепторов очевидна возможность влияния через вторичных посредников. А каков может быть механизм взаимосвязи между никотиновыми рецепторами и пресинаптическими кальциевыми каналами?

Научно-практическая ценность и рекомендации по применению результатов работы. Данная работа проясняет механизм ауторегуляции секреции медиатора, обеспечивающий реализацию надежности работы нервно-мышечного соединения.

Полученные данные могут быть полезны при создании новых фармакологических препаратов, используемых в качестве миорелаксантов, поскольку механизм ауторегуляции выброса медиатора раскрывает пресинаптическое действие препаратов подобного типа.

Результаты работы могут быть полезны различным научным коллективам, занимающимся изучением способов регуляции синаптической передачи, например, кафедре физиологии человека и животных МГУ им. М.В. Ломоносова, в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН, в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН и др.

Заключение

По актуальности темы исследования и выбору методов, по оригинальности, достоверности и ценности полученных результатов существенных замечаний к работе нет.

Высказанные замечания относятся к изложению и, следовательно, не умаляют значимости работы. Вопросы, которые возникают при анализе работы, свидетельствуют не о недостатках, а об актуальности работы и необходимости продолжать исследования в данном направлении.

В целом, представленная к защите диссертация Хазиева Эдуарда Фаритовича «Изменение кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании под действием холинергических агентов», выполненная под руководством к.б.н. Самигуллина Д.В., является квалификационным научным исследованием, содержащим решение одной из актуальных задач биофизики – изучение механизма ауторегуляции выброса медиатора как фактора обеспечения надежности синаптической передачи. По объему, актуальности, научной новизне, целостности, законченности, практической значимости и публикациям диссертационная работа полностью соответствует критериям кандидатской диссертации, изложенным в Разделе II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор – Хазиев Эдуард Фаритович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.02 – биофизика.

Диссертация и отзыв обсуждены на заседании лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ИЭФБ РАН) 13.05.2015, протокол №3.

Заведующий лабораторией

Биофизики синаптических процессов

ИЭФБ РАН

д.б.н.

Денисов Денис Борисович
Денисов Денис Борисович
Денисов Денис Борисович

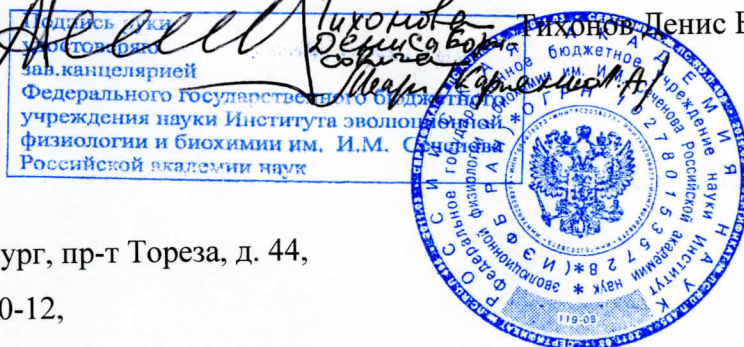
Денисов Денис Борисович

ИЭФБ РАН

194223, г. Санкт-Петербург, пр-т Тореза, д. 44,

+7(812)552-79-01; 552-30-12,

e-mail: office@iephb.ru



С отзывом ознакомлен 03.06.2015 [Signature]