

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

**на диссертационную работу Проскуриной Светланы Евгеньевны,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 03.01.02 – биофизика и 03.03.01 – физиология,
на тему «Влияние оксида азота (NO) на активность фермента
ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы»**

Исследования, посвященные механизмам регуляции и модуляции синаптической передачи, проводятся во многих ведущих лабораториях мира, поскольку события, протекающие на синаптическом уровне, во многом определяют функционирование нервной системы в целом. Нервно-мышечный синапс, с одной стороны, являясь классическим объектом для исследования базовых механизмов нейротрансмиссии, характеризуется целым рядом особенностей, обеспечивающих быстрое и надежное проведение возбуждения с двигательного нерва на мышечные волокна. Одна из таких связана с концентрированием в синаптической щели ацетилхолинэстеразы (АХЭ), менее чем за 1 мс расщепляющей ацетилхолин после освобождения из нервных окончаний, что необходимо для быстрого «выключения» холинорецепторов и предотвращения их десенситизации. С другой стороны, при некоторых заболеваниях, сопровождающихся снижением эффективности нервно-мышечной передачи, частичная блокада АХЭ может быть полезной. Вопрос о существовании и физиологической роли модуляции активности АХЭ эндогенными молекулами остается недостаточно изученным, и представленная диссертация обращается к этой проблеме, рассматривая оксид азота (NO) как возможный регулятор.

Основным методическим подходом в работе была микроэлектродная регистрация миниатюрных токов концевой пластинки (МТКП), амплитуда и временные параметры которых зависят от концентрации ацетилхолина в синаптической щели. Анализ МТКП позволяет только косвенно оценить активность АХЭ, поэтому дополнительно был применен более прямой спектрофотометрический подход (в условиях *in vitro*). Необходимые контрольные эксперименты представлены в работе. Используемые методы, в совокупности с фармакологическими манипуляциями и статистическим анализом, позволили

автору получить данные, на основании которых можно судить о значении NO в регуляции активности АХЭ в нервно-мышечном синапсе.

В отношении экспериментальной части работы можно сказать, что она хорошо структурирована и объединена внутренней логикой в целостное исследование. Вначале автором было показано, что в условиях *in vitro* донор NO (SNAP) в диапазоне от 0.1 до 1мМ способен дозо-зависимо ингибировать АХЭ эритроцитов и гомогената мышцы *extensor digitorum longus*. В интактных мышцах, применение SNAP (начиная с 0.2 мМ) также вызывало характерные для ингибиторов АХЭ изменения МТКП, которые были обратимы и не проявлялись на фоне 10 мкМ параоксона, практически полностью блокирующего АХЭ. Полностью согласен с автором, что всё это указывает на способность донора NO (0.2-2 мМ SNAP) снижать активность АХЭ в нервно-мышечном синапсе. В присутствии гемоглобина, способного хелатировать внеклеточный NO, эффект 2мМ SNAP существенно ослаблялся, однако сам гемоглобин не имел эффектов на параметры МТКП. Эти эксперименты свидетельствуют о том, что эффект, по крайней мере, 2мМ SNAP на АХЭ связан с освобождением им NO, но тонический зависимый от NO контроль АХЭ отсутствует. В качестве подхода для стимуляции эндогенной продукции NO в синапсе автор применил фармакологическую стимуляцию глутаматных рецепторов с помощью 100 мкМ глутамата в присутствии 700 мкМ глицина, которая в без магниевого растворе вызывала небольшую деполяризацию концевой пластинки, связанную с активацией NMDA-рецепторов. В работе было показано, что продолжительная (40-60 мин) активация глутаматных рецепторов вызывает характерные изменения МТКП, которые подавлялись на фоне блокирования АХЭ (параоксоном), неселективного ингибитора NO синтаз (L-NAME), хелатора NO (гемоглобина), ингибитора протеин фосфатаз (окадаиковой кислоты). При этом сами аминокислоты в системе *in vitro* не влияли на АХЭ. На этом основании в диссертации выдвинута «жизнеспособная» гипотеза, что фармакологическая активация NMDA-рецепторов, может зависимым от фосфатаз и NO путем подавлять АХЭ. В последствие была произведена попытка оценить возможность эндогенного глутамата, освобождаемого в ходе ритмической активности (10Гц), запускать связанное с активацией NMDA-рецепторов и NO синтазы ингибирование АХЭ. Доводы в пользу существования такого механизма

были обнаружены только в физиологическом растворе с добавлением глицина в высокой концентрации 700 мкМ, которая в норме не встречается в плазме крови. Исходя из анализа результатов работы, можно согласиться с описанными автором положениями, выносимыми на защиту, что активность АХЭ в нервно-мышечном соединении может быть снижена под действием NO, который может продуцироваться в необходимых количествах при активации NMDA-рецепторов.

Ключевые результаты диссертации доложены на профильных конференциях с международным участием, а основная часть представленного исследования опубликована в авторитетном издании *European Journal of Neuroscience* (2013, индексируется в международных базах Scopus, Web of Science) с участием диссертанта. Также имеются статьи в рецензируемых отечественных журналах (*Доклады Академии Наук, Гены и Клетки*), рекомендованных ВАК. В главе «Результаты исследования» в параграфах, описывающих результаты совместных экспериментов, отмечены соавторы статей, принимавших участие в постановке экспериментов наряду с диссертантом.

Проведенное исследование дает понимание того, как изменения активности эндогенной АХЭ под влиянием NO могут модулировать биофизические процессы, обеспечивающие возбуждение постсинаптической мембраны. В рамках диссертационной работы впервые получены убедительные данные, указывающие на существование NO-зависимого ингибирования АХЭ в нервно-мышечном соединении, которое может запускаться при активации глутаматных NMDA-рецепторов. Эти результаты расширяют представления о механизмах регуляции нервно-мышечной передачи и могут быть в дальнейшем развиты в направлении выяснения физиологического и/или патологического значения обнаруженного механизма. Следовательно, в кандидатской диссертации Проскуриной С.Е. содержится решение важного для синаптологии вопроса о возможности регуляции АХЭ нервно-мышечного синапса млекопитающего газомедиатором NO.

В отношении структуры диссертации можно сказать, что она имеет классические главы и относительно легко читается. Обзор литературы (Глава 1) занимает объем примерно в полтора раза больший, чем глава «Результаты исследования», и содержит общие представления о нервно-мышечном синапсе, функционировании АХЭ, никотиновых ацетилхолиновых и глутаматных NMDA

рецепторах, а также NO-зависимой сигнализации. Главы «Методы» и «Результаты исследования» написаны компактно и понятно. Результаты исследования изложены в четкой логичной последовательности с пояснениями связей между соседними параграфами. В заключительной небольшой главе «Обсуждение результатов» продемонстрирована связь проделанной работы с имеющимися в литературе данными. Выводы соответствуют поставленным задачам и цели исследования. Стоит отметить объемный список цитируемой литературы (353 источника, большинство 1990-2010 гг.), который занимает объем, сопоставимый с обзором литературы. Диссертация включает немного иллюстраций, 12 рисунков, 10 из которых описывают собственно результаты. Содержание автореферата полностью соответствует материалам, имеющимся в диссертации.

При ознакомлении с диссертацией возникли вопросы и замечания.

(1) При чтении главы результатов сложно было оценить количество независимых экспериментов на отдельных животных, выполненных в конкретной серии, т.к. в качестве «n» использовалось количество измерений в отдельных мышечных волокнах. Зачастую числовые данные в процентах даны без указания стандартных ошибок и p , что затрудняет понимания значимости изменений. Большинство рисунков, описывающих результаты, не содержат нативных постсинаптических сигналов, что не дает возможность читателю увидеть исходные данные. Также отсутствуют иллюстрации, показывающие развитие эффекта во времени, хотя в тексте и выводах обсуждается динамика.

(2) Несмотря на то, что работа посвящена NO, не были использованы подходы, позволяющие «визуализировать» образование этого газообразного посредника в нервно-мышечном препарате. Поэтому об эндогенной продукции NO можно судить только по косвенным данным, полученным при использовании ингибитора NO₂ синтаз (L-NAME) и гемоглобина, способного связывать NO.

(3) В случае применения донора NO (2 мМ SNAP) затягивание спада МТКП было значительно меньше выражено, по сравнению с блокированием АХЭ параоксоном, тогда как амплитуды МТКП возрастали в схожей степени в обоих случаях. По биохимическим данным 2мМ SNAP полностью ингибирует АХЭ, как и параоксон. Как можно это объяснить? К тому же стимуляция продукции

эндогенного NO глутаматом (в присутствии глицина), увеличивая амплитуду МТКП, не изменяла τ спада.

(4) Для активации глутаматных NMDA рецепторов использованы высокие концентрации глутамата и особенно глицина (0.7 мМ). При этом эффект наблюдался спустя 30-40 минут аппликации, когда многие рецепторы должны были перейти в состояние десенситизации. Возможно, глутамат требуется только для запуска эффекта, но не для его проявления. Были ли проведены эксперименты с более короткой аппликацией глутамата и есть ли данные о динамике десенситизации NMDA рецепторов? В этой части было бы логично попробовать комбинацию глутамата с D-серином, который также присутствует в плазме крови. Обнаруженное небольшое (около 10%) действие эндогенного глутамата проявлялось только в условиях высокой концентрации глицина (0.7 мМ), которая не характерна ни для плазмы крови, ни периферических тканей. Следовательно, делать «заключение, что в процессе нормального функционирования синапса» работает описанный механизм, преждевременно. И исходя из результатов работы, физиологическое значение обнаруженного механизма остается не понятным.

(5) Связь между фосфатазами PP1 и PP2A и продукцией NO не столь очевидна, как пишет автор, и фосфатазы могут воздействовать на множество мишеней, влияющих специфично на активность разных изоформ NO-синтаз. Поэтому положение о том, что активация NMDA рецепторов запускает путь, ведущий к дефосфорилированию NO-синтазы, без анализа степени фосфорилирования NO-синтаз эндотелиальной и нейрональной изоформ, выглядит как гипотеза, а не вывод.

Высказанные замечания и вопросы не влияют на общую высокую оценку диссертационного исследования, и не ставят под сомнения ключевые результаты исследования. В целом, работа показалась очень интересной и имеющей большой потенциал для развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ диссертационной работы указывает на ее актуальность, высокую значимость полученных результатов, выводов и их новизну, а также на соответствующее качество публикаций и личное участие диссертанта. Все это позволяет заключить, что диссертация Проскуриной Светланы Евгеньевны

«Влияние оксида азота (NO) на активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, соответствует специальностям 03.01.02. – биофизика и 03.03.01 – физиология, и представляет собой законченный авторский научно-квалификационный труд, содержащий решение важной задачи, посвященной механизму регуляции АХЭ в нервно-мышечном синапсе, в частности, со стороны пути глутамат+глицин / NMDA-рецептор / NO-синтаза / NO.

По методическому уровню, объему выполненной работы, ее качеству, новизне и значимости для биологии диссертационная работа Проскуриной Светланы Евгеньевны «Влияние оксида азота (NO) на активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы», полностью соответствует критериям ВАК Министерства образования и науки РФ (глава II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Проскурина Светлана Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 – «биофизика» и 03.03.01 – «физиология».

Доцент кафедры нормальной физиологии
ФГБОУ ВО «Казанский государственный
медицинский университет»
кандидат биологических наук



Подпись <i>Петрова А.М.</i>	удостоверяю.
Специалист по кадрам <i>Сидорова</i>	
« 25 »	03 20 16 г.

Петров Алексей Михайлович

дата

*29 сентября
2016*

ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49, кафедра нормальной физиологии, Тел. +7 906 320-11-40; e-mail: fysio@rambler.ru, Петров А.М., доц., к.б.н.