

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе СПбГУ

С. В. Аплонков



2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» на диссертационную работу Проскуриной Светланы Евгеньевны «Влияние оксида азота (NO) на активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика, 03.03.01 – физиология

Актуальность темы выполненной диссертационной работы

Проблема изучения механизмов пластичности нервно-мышечной передачи является одной из наиболее интенсивно разрабатываемых в современной нейрофизиологии, причем значительное место занимает выяснение механизмов регуляции квантовой секреции медиатора из нервных окончаний. Диссертационная работа С.В. Проскуриной посвящена совершенно другому механизму регуляции синаптической функции, основанному на модуляции активности фермента ацетилхолинэстеразы, которая определяет кинетику постсинаптических процессов и фактор надежности (safety factor) нервно-мышечной передачи. В работе рассмотрена возможность регуляции активности ацетилхолинэстеразы таким эндогенным регулятором как оксид азота. Интерес к оксиду азота не ослабевает в течение многих лет, поскольку область влияния этого мессенджера на различные клеточные процессы чрезвычайно широка. В данной работе впервые исследованы особенности влияния этого газообразного посредника на амплитудно-временные характеристики постсинаптических ответов, определяемые активностью синаптической (функциональной) ацетилхолинэстеразы. Разработки в этом направлении представляются весьма перспективными, так как раскрывают физиологическую роль оксида азота в нейромоторном синапсе и расширяют наши

представления о фундаментальных молекулярных механизмах синаптической пластичности. Подобные исследования важны и с прикладной точки зрения. Таким образом, диссертационная работа С.В. Проскуриной во всех отношениях является актуальной.

Научная новизна полученных результатов

Автором диссертационной работы впервые получены доказательства возможности быстрой модуляции активности ацетилхолинэстеразы нервно-мышечного синапса таким газообразным мессенджером как оксид азота. Оригинальными и новыми являются данные о том, что донор оксида азота SNAP, подобно классическим ингибитором ацетилхолинэстеразы, увеличивает амплитуду и длительность фазы спада постсинаптических ответов в нервно-мышечном соединении теплокровных. К наиболее важным результатам относятся впервые полученные данные о том, что снижение активности синаптической ацетилхолинэстеразы могут вызывать молекулы оксида азота эндогенного происхождения, синтез которых инициируется активацией NMDA-рецепторов. Автором впервые установлено, что активация NMDA-рецепторов агонистами как эндогенного, так и экзогенного происхождения может приводить либо к быстрой активации синтазы оксида азота, либо к отложенной во времени модуляции активности этого фермента при участии серин-треонин-протеин фосфатаз. В целом, впервые показан новый возможный механизм тонкой эндогенной модуляции эффективности холинергической передачи.

Научно-практическая ценность полученных автором результатов

Полученные результаты важны не только в чисто научном плане, но и с прикладной точки зрения, поскольку такие знания могут быть востребованы при создании новых фармакологических препаратов центрального и периферического действия, могут открыть новые пути коррекции патологий нервно-мышечного аппарата. Данные о возможности быстрой эндогенной модуляции активности одного из ключевых ферментов холинергической передачи оксидом азота необходимо учитывать при использовании доноров оксида азота в медицинской практике. Возможность ингибирования ацетилхолинэстеразы оксидом азота

эндогенного происхождения при участии комплекса NMDA-рецептор/NO-синтаза открывает новые перспективы в изучении функции этих рецепторов в нервно-мышечном синапсе.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и заключений

В диссертационном исследовании автор использует комплекс самых современных методов, включая микроэлектродный метод регистрации постсинаптической активности; методы биохимического и фармакологического анализа. Методы полностью соответствуют поставленным в работе задачам. Результаты экспериментов хорошо документированы, иллюстративный материал обширен и свидетельствует о высоком качестве экспериментальных данных. Все исходные данные тщательно обработаны и подвергнуты разностороннему анализу. Обсуждение и оценка собственных результатов проведены автором корректно и не вызывают возражений. При обсуждении результатов рассмотрены различные варианты трактовок с привлечением обширного списка публикаций по данной проблеме. Результаты исследования подробно отражены в 12 опубликованных научных работах, 3 из которых представляют собой статьи в рецензируемых журналах, включенных в список ВАК и реферативную базу SCOPUS. Учитывая обширный экспериментальный материал, современный уровень исследований и анализа результатов, апробацию работы на достаточно большом числе отечественных и международных научных собраний, достоверность научных положений, выводов и заключений не вызывает никаких сомнений.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа построена по традиционному принципу, изложена на 134 страницах машинописного текста и включает 12 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 353 источника (из них 351 иностранных).

Во «Введении» кратко изложена суть проблемы, обоснованы цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту. Данная часть

диссертации четко соотносится с выводами, сделанными в конце работы на основании анализа полученных результатов.

Глава «Обзор литературы» представляет собой детальный анализ современных представлений по рассматриваемой проблеме. В частности, обсуждаются механизмы регуляции нервно-мышечной передачи, дается подробная информация об особенностях молекулярного строения и функционирования ацетилхолинэстеразы, оксида азота, а также NMDA рецепторов в области нервно-мышечного контакта. Дается анализ степени изученности проблемы. Обзор написан хорошим литературным языком, автор успешно отразил данные большого количества как современных, так и классических исследований по изучаемой проблеме. В целом, обзор литературы свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния в данной области и является солидным теоретическим фундаментом, используемым в дальнейшем для описания и обсуждения результатов. Эта часть работы также позволила автору не только охарактеризовать всю проблему в целом, но и логически обосновать цель и задачи исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» описаны биофизические, электрофизиологические и биохимические методы, а также примененные способы статистической обработки. Условия проведения опытов описаны весьма квалифицированно и достаточно подробно. Эта часть дает необходимую информацию о методических особенностях данной работы. Корректность выбора объектов исследования, а также адекватность методических приемов не вызывают сомнений.

Главы «Результаты исследований» и «Обсуждение результатов» представляют собой значительную часть диссертационной работы. Как уже отмечалось выше, новизна и научно-практическая ценность полученных автором экспериментальных данных не вызывают сомнений. В главе «Обсуждение результатов» предпринимается успешная попытка интеграции полученных данных в существующие научные представления о процессах регуляции нервно-мышечной передачи. Диссертация завершается общим «Заключением» и предложенной автором гипотетической схемой метаболического пути эндогенного ингибирования ацетилхолинэстеразы молекулами оксида азота в нервно-мышечном синапсе.

На основании полученных результатов сделано 8 выводов, которые логически вытекают из результатов и полностью соответствуют положениям, вынесенным на защиту.

Автореферат содержит описание основных наиболее значимых серий экспериментов и их обсуждение и полностью отражает основное содержание работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов данной работы

Полученные автором результаты могут быть успешно внедрены в работу лабораторий, занимающихся фундаментальными механизмами нервно-мышечной передачи и практическими вопросами в этой области. Поскольку данная работа свидетельствует о наличии взаимодействия оксида азота и синаптической ацетилхолинэстеразы, ее результаты необходимо учитывать при совместном применении доноров оксида азота и веществ, оказывающих влияние на активность синаптической ацетилхолинэстеразы, в частности, блокаторов данного фермента при лечении патологий нервно-мышечной передачи. Экспериментальные данные, изложенные в работе, могут быть использованы в клинической практике, в научных учреждениях и коллективах, занимающихся изучением эндогенных модуляторов синаптических процессов, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии, биофизике и нейрофармакологии.

Диссертационная работа написана литературным научным языком и не вызывает значительных замечаний по форме, способу изложения или содержанию работы. Тем не менее, по итогам ознакомления с диссертацией, возник ряд вопросов и замечаний.

Вопросы:

- 1) Отличаются ли молекулярные формы синаптической ацетилхолинэстеразы в m. EDL и ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека?
- 2) Хорошо известно (см. Miledi et al., 1984), что скорость гидролиза субстрата в интактных мышцах и в гомогенатах мышц существенно различается. В последнем случае отсутствуют диффузионные барьеры, кроме того в реакцию вступают, помимо синаптического, внесинаптический и внутриклеточный пулы ацетилхолинэстеразы. Учитывает ли автор эти обстоятельства?

- 3) Изменялась ли моно-экспоненциальность фазы спада МТКП при действии разных концентраций донора оксида азота SNAP, что свидетельствовало бы о нарушении кинетики ионных каналов никотиновых холинорецепторов или их блокаде?

Замечания:

- 1) Вызывает вопрос наличие всего двух отечественных работ в списке цитированной литературы.
- 2) Несмотря на обширность литературного обзора, недостаточно внимания уделено механизмам влияния антихолинэстеразных веществ на амплитудно-временные характеристики МТКП (задержанная диффузия, повторные связывания медиатора с холинорецепторами и т.д.).
- 3) По-видимому, не стоит относить газообразные мессенджеры к комедиаторам (стр. 30).
- 4) Ошибкой является отнесение физостигмина и др. к необратимым ингибиторам ацетилхолинэстеразы (стр. 19).
- 5) При обсуждении влияния донора оксида азота на амплитудно-временные характеристики МТКП желательно сравнивать наблюдаемые эффекты с известными из литературы эффектами ингибиторов ацетилхолинэстеразы (стр. 57-58).
- 6) В списке сокращений отсутствует расшифровка аббревиатуры SNAP (стр. 4).
- 7) Встречаются неудачные выражения вроде: ...рецепторы ... закрепляются в мембране концевой пластинки с помощью белка рапсина весом в 43 кДа (стр. 26).

Следует отметить, что указанные замечания не являются принципиальными и не снижают общего положительного впечатления о работе.

Заключение

Таким образом, диссертация Проскуриной Светланы Евгеньевны на тему «Влияние оксида азота (NO) на активность фермента ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном синапсе крысы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной, выполненной с использованием современных методов, научно-квалификационной работой,

направленной на решение актуальной проблемы в области физиологии и биофизики нервно-мышечной передачи.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук (пункт № 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842), а ее автор Проскурина Светлана Евгеньевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика, 03.03.01 – физиология.

Отзыв составлен доктором биологических наук, профессором кафедры общей физиологии И. И. Кривым.

Отзыв заслушан и одобрен на заседании кафедры общей физиологии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета (протокол № 29 от 26.09.2016 г.).

26 сентября 2016 г.

Заведующий кафедрой
общей физиологии СПбГУ,
доктор биологических наук,
профессор

А. Г. Марков

Профессор кафедры Общей физиологии СПбГУ,
доктор биологических наук

И.И. Кривой

Почтовый адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9 Лигер А,
Биологический факультет СПбГУ, кафедра Общей физиологии
Телефон: (812) 328-95-89
E-mail: iikrivoi@gmail.com

Личные подписи Маркова А.Г. и Кривой И.И.

ЗАВЕРЯЮ

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ

