

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

Института эволюционной физиологии и
биохимии им. И.М. Сеченова

Российской академии наук

член-корр. РАН, д.б.н. М. Л. Фирсов



«25» ноября 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Жилякова Никиты Викторовича
«Роль холинорецепторов в регуляции кальциевого транзientа и
освобождения нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе мышцы»,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.2 – Биофизика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационное исследование Жилякова Н.В. посвящено актуальной проблеме оценки роли холинорецепторов двигательного нервного окончания в регуляции кальциевого транзientа и секреции нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе теплокровных животных (мышь). Тот факт, что надежность передачи сигнала в нервно-мышечном синапсе зависит, помимо прочего, от регуляции освобождения последующих порций АХ за счет взаимодействия этого медиатора с рецепторами, находящимися на пресинаптической мембране (ауторегуляция секреции нейромедиатора), хорошо известен. Однако, детальные механизмы процесса этой ауторегуляции выделения АХ остаются не ясными. Настоящее исследование направлено на изучение вклада активации никотиновых и мускариновых, пресинаптических холинорецепторов в изменение амплитуды кальциевого транзientа и процесса выделения нейромедиатора в двигательных синапсах мышь. Полученные в работе данные, вне сомнения, важны, как для лучшего понимания нормальной

функции нервно-мышечного синапса, так и для понимания патогенеза миостенических синдромов и фармакологии применения миорелаксантов.

Степень обоснованности основных научных положений, выводов и практических рекомендаций

Целью исследования диссертанта было изучение вклада пресинаптических холинорецепторов в изменение амплитуды кальциевого транзientа и процесса выделения нейромедиатора в двигательных синапсах мышцы. На основании цели были сформулированы 5 задач: разработать экспериментальный метод оценки кальциевого транзientа в двигательных нервных окончаниях мышцы с помощью флуоресцентного красителя (1); оценить изменения амплитуды кальциевого транзientа при блокаде разных типов потенциал-зависимых кальциевых каналов и модуляции рианодиновых рецепторов (2); исследовать эффекты активации и блокады никотиновых (3) и мускариновых (4) холинорецепторов на амплитуду кальциевого транзientа и параметры квантовой секреции ацетилхолина и оценить участие кальциевых каналов и рианодиновых рецепторов в реализации эффектов холинергических агентов (5).

Для решения поставленных задач автором был разработан адекватный дизайн исследования и проведен значительный по объему блок экспериментальной работы. Для анализа результатов исследования применен корректный набор методов математико-статистической обработки. Постановка цели и задач работы конкретны и логичны. Методы исследования адекватны поставленным задачам.

Представленные выводы четко сформулированы и полностью обоснованы полученными результатами исследования. На защиту вынесено два положения. Достоверность результатов подтверждена корректной статистической обработкой и тщательным анализом полученных данных, что дает основание считать вполне обоснованными выводы и основные положения, выносимые на защиту.

Новизна полученных результатов и выводов

Автором работы был разработан и апробирован уникальный метод загрузки кальциевого красителя в двигательные синапсы мышцы через культю нерва, позволяющий регистрацию изменения уровня кальция в аксоплазме двигательного нервного окончания мышцы в ответ на электрический стимул. С использованием этого метода были получены и сопоставлены данные об изменениях квантового выброса медиатора и кальциевого транзиента в двигательном нервном окончании мышцы при активации холинорецепторов нервного окончания. Впервые было показано, что активация нейрональных никотиновых холинорецепторов сопровождается увеличением входа ионов кальция в двигательную терминаль через каналы L-типа, тогда как активация мускариновых рецепторов приводит к снижению величины кальциевого транзиента, за счет модуляции работы P/Q-типа каналов и рианодиновых рецепторов.

Апробация работы и публикации

Результаты работы были апробированы на российских и международных конференциях. По теме диссертационной работы опубликовано 16 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ (включая 1 статью опубликованную в *Int. J. Mol. Sci.*, Scopus Q1 и одну статью – в *J. Vis. Exp.*, Scopus Q2).

Структура и содержание работы

Диссертация изложена на 171 странице, состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка литературы (всего 381 источник). Работа содержит 36 рисунков и 4 таблицы.

В главе 1 («Обзор литературы») описан процесс нейротрансмиссии в холинергическом синапсе с исчерпывающим обзором роли разных типов кальциевых каналов и пресинаптического кальциевого гомеостаза в этом процессе. Кроме того, в этом разделе подробно обсуждена и имеющиеся литература о роли никотиновых холинорецепторов в регуляции квантового высвобождения в нервно-мышечном синапсе, а также информация о существующих методах исследований электрической активности и Са гомеостаза в синапсе. Обоснованно, в соответствии с задачей исследования, последняя тема (свойства Са-чувствительных флуоресцентных зондов, методы их загрузки в клетки и т.п.) раскрыта наиболее подробно.

Глава 2 («Материалы и методы») предоставляет детальное описание экспериментальных животных, материалов и реагентов, протоколов и методов, используемых в работе. Достаточно подробно и иллюстративно описаны схема экспериментов, связанных с загрузкой нервных окончаний синапса млекопитающих флуоресцентным зондом и протокол регистрации Са транзиента. Также приведено описание подходов к статистической обработке данных.

Первая часть главы «Результаты и обсуждение» (разделы 3.1 – 3.5) посвящена валидации модели, используемой в работе. Первое (раздел 3.1), было показано, что процедура загрузки красителя в НО, выполненная согласно протоколу исследования, не влияет на параметры вызванной и спонтанной секреции медиатора. Второе (раздел 3.2), было продемонстрировано, что вызванный флуоресцентный сигнал (Са транзиент) остается стабильным со временем эксперимента, по крайней мере в течение 1.5 часов после приготовления препарата. Третье (раздел 3.3), было показано, что зависимость квантового состава от изменения амплитуды кальциевого транзиента при варьировании концентрации кальция во внеклеточной среде, близка к линейной с наклоном предполагающим, что для выделения одного кванта нейромедиатора в

синапсе мышцы необходимо взаимодействие по крайней мере 3 ионов кальция с белками экзоцитоза. Четвертое (раздел 3.4), было показано, что блокада потенциал-чувствительных кальциевых каналов кадмием приводит к значительному доз-зависимому понижению амплитуды кальциевого транзientа. Наконец пятое (раздел 3.5), в экспериментах с селективной блокадой разных подтипов Са каналов было продемонстрировано, что в нормальных условиях Са каналы P/Q- (до 80%) и в меньшей степени L- (до 20%), но не N-типа вносят основной вклад в формирование входа кальция в клетку и инициацию процесса вызванной секреции квантов медиатора. Кроме того, согласно полученным данным 6-7% регистрируемого Са транзientа может быть обусловлено выбросом Са из эндоплазматического ретикулума через рианодиновые рецепторы.

Во второй части главы 3 (раздел 3.6 «Роль никотиновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выделения нейромедиатора») описаны эксперименты, направленные на выявление роли активации никотиновых рецепторов в регуляции синаптической передачи и механизмов этой регуляции. Было показано, что активация нейрональных никотиновых рецепторов приводит к увеличению амплитуды кальциевого транзientа, но уменьшению квантового выброса. Первый эффект был связан с активацией кальциевых каналов L-типа. Второй эффект, предположительно, был связан с тем, что вход Ca^{2+} через каналы L-типа может приводить к активации коклюш-токсин чувствительных G-белков, ведущей к уменьшению количества высвобождаемых квантов медиатора.

В третьей части «Результатов и обсуждения» (раздел 3.7 «Роль мускариновых рецепторов в регуляции пресинаптического уровня кальция и выделения нейромедиатора») исследована роль активации мускариновых рецепторов в регуляции синаптической передачи и механизмов этой регуляции. Были приведены данные свидетельствующие, что нейрональные мускариновые рецепторы (как M1, так и M2 подтипа)

активируются тонически эндогенно выделяемым ацетилхолином, что приводит к уменьшению как амплитуды кальциевого транзиента, так и квантового выброса. Было также показано, что мускариновые рецепторы связаны с контролем амплитуды Ca транзиента как через угнетение работы кальциевых каналов P/Q-типа так подавляя выброса кальция из эндоплазматического ретикулума нервного окончания.

Представленные результаты подробно обсуждены и в конце сделано заключение, в котором дана комплексная оценка роли активации никотиновых и мускариновых рецепторов нервного окончания в ауторегуляции секреции нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе млекопитающих.

Важно отметить высокий методический уровень работы (сам метод загрузки нервных окончаний флуоресцентным Ca зондом и элегантное использование множества селективных агонистов и антагонистов разных каналов и рецепторов) и четкую структуру и хороший литературный уровень изложения представленного в диссертации материала.

Соответствие содержания диссертации автореферату и указанной специальности

Автореферат отражает основное содержание диссертации, оформлен в соответствии с требованиями ВАК РФ и соответствует специальности 1.5.2 – Биофизика.

Вопросы и замечания

1. В работе, квантовый состав оценивался путем деления средних амплитуд ПКП на средние амплитуды мПКП. Этот подход корректен для низкоамплитудных вызванных сигналов, но может занижать квантовый состав высокоамплитудных ПКП из-за не линейной суммации мПКП по мере приближения сигнала к потенциалу реверсии. На сколько, по

мнению автора, эта ошибка может сказаться на интерпретации и основных выводах работы?

2. Вышеприведенный вопрос относится, в частности, к интерпретации данных, представленных на рисунке 12г. Понятно, что зависимость квантового состава от величины кальциевого транзientа может быть аппроксимирована линейной функцией, как и сделано автором. Однако, очевидно, что реальная зависимость не линейная, а имеет тенденцию к насыщению. Не является ли эта тенденция, как-раз результатом занижения квантового состава высокоамплитудных потенциалов?
3. Основное замечание – все измерения сделаны в режиме стимуляции препарата с низкой частотой. В то же время нормальный разряд моторного нейрона состоит из пачки высокочастотных потенциалов действия. При таком разряде можно ожидать и более выраженных, и более физиологически и клинически релевантных, чем наблюдаемые при низкочастотной стимуляции, эффектов синаптической ауторегуляции. Вне сомнения диссертант учтет это в своих будущих исследованиях
4. Количество опубликованных по теме диссертации работ, указанное в абстракте – 16, а в диссертации – 19. Судя по списку работ, приведенном в абстракте, последняя цифра ошибочна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Жиликова Никиты Викторовича «Роль холинорецепторов в регуляции кальциевого транзientа и освобождения нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе мышцы» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной автором самостоятельно на высоком научно-методическом уровне. Актуальность, научная новизна, объем проведенных исследований, современное методическое обеспечение, достоверность полученных данных, их научная трактовка позволяют заключить, что диссертационная работа Жиликова Н.В. (Биофизика),

полностью удовлетворяет требованиям Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 26 сентября 2022.г. №1690 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор, Жиляков Никита Викторович заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 – Биофизика (направления исследований - общая биофизика и биофизика клетки).

Отзыв ведущего учреждения рассмотрен и одобрен на совместном заседании коллективов группы нейрорегуляции мышечной функции и лаборатории молекулярных механизмов нейронных взаимодействий.

Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Адрес: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44

Тел.: +7 (812) 552-79-01

Электронная почта: office@iephb.ru

Сайт: www.iephb.ru

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Группы нейрорегуляции мышечной
функции
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
194223, Россия, г. Санкт-Петербург,
пр. Тореза, д. 44,
+7 (912) 898-46-85
dobretsovmaxim@gmail.com

Добрецов Максим
Георгиевич



Добрецов М.Т.
(Инициалы)
25.11.2022