

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»



проф. член-корр. РАН Калачев А.А.

« 27 / 2022 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»»

Диссертация на тему «Роль холинорецепторов в регуляции кальциевого транзientа и освобождения нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе мышцы» выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»».

В период подготовки диссертации соискатель Жилияков Никита Викторович прошел обучение в очной аспирантуре по направлению подготовки 06.06.01. Биологические науки, специальность 1.5.2. «Биофизика» с 01.09.2016 по 31.08.2020 гг.; с 2016 г. по настоящее время работает в лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»» в должности младшего научного сотрудника.

В 2016 году с отличием окончил ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по направлению подготовки 06.04.01 Биология по профилю «Нейробиология».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2022 г. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2022 г. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук».

Научный руководитель – Самигуллин Дмитрий Владимирович, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казанский институт биохимии и биофизики, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник.

С рецензией на работы выступил доктор биологических наук, Петров Алексей Михайлович, отметив высокий уровень работы, современных экспериментальных методов и количество публикаций по теме диссертационного исследования. По мнению проф. А.М. Петрова результаты проведенного исследования являются достоверными, они хорошо иллюстрированы рисунками и таблицами. Выводы хорошо обоснованы и соответствуют задачам проведенного исследования. Сделаны незначительные замечания по опечаткам и несоответствию пунктуации. Высказанные замечания не носят принципиального характера и не умаляют оригинальности и достоверности полученных данных. Работа соответствует критериям, предъявляемым диссертациям на соискание степени кандидата наук.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Жиликова Н.В. посвящена изучению аспектов холинергической ауторегуляции выделения ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе мышцы. Работа соответствует паспорту специальности 1.5.2. – «Биофизика», области исследования - биофизика клетки: биофизика мембран, биофизика ионных каналов, биофизика мышечного сокращения:

Разработанный экспериментальный метод оценки кальциевого транзиента в двигательных нервных окончаниях мышцы с помощью флуоресцентного красителя позволяет оценивать изменения кальциевого транзиента в синапсах теплокровных животных. Кроме того, данный метод позволяет оценивать изменения концентрации других ионов в нервных окончаниях, при использовании соответствующих флуоресцентных красителей.

Полученные в работе данные раскрывают новые пути модуляции нервно-мышечной передачи и могут в будущем внести вклад в разработку терапевтических подходов нейродегенеративных заболеваний, связанными с нарушениями холинергической передачи, соответственно, материалы диссертационной работы имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Личный вклад соискателя в исследование.

Жиляков Н.В. непосредственно принимал участие в планировании исследований, разработке схем экспериментов, выполнении экспериментов, обработке и анализе полученных данных. Оформление публикаций проходило при личном участии соискателя.

Достоверность полученных данных.

Использованные методы и подходы соответствуют поставленной цели и задачам. В экспериментах применены методы, позволяющие оценить взаимосвязанные аспекты синаптической передачи: оптический метод с использованием кальциевого красителя для оценки кальциевого транзientа в синапсах и электрофизиологический метод, а также фармакологический подход с использованием селективных блокаторов. Полученные результаты корректно обработаны статистически, их достоверность не вызывает сомнения.

Научная новизна исследования.

Разработан метод для загрузки кальциевого красителя в двигательные синапсы мышцы через культуру нерва. Применение данного подхода позволяет регистрировать изменения уровня кальция в аксоплазме двигательного нервного окончания мышцы в ответ на электрический стимул. Проведено сопоставление данных об изменениях квантового выброса медиатора и кальциевого транзientа в двигательном нервном окончании мышцы при варьировании концентрации кальция во внеклеточном пространстве. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что амплитуда флуоресцентного кальциевого транзientа позволяет оценивать пресинаптический уровень кальция, ответственный за выделение квантов нейромедиатора.

Впервые показано, что активация нейрональных никотиновых холинорецепторов сопровождается увеличением входа ионов кальция в двигательную терминаль через каналы L-типа.

Впервые показано, что активация мускариновых рецепторов приводит к снижению величины кальциевого транзientа, что зависит от каналов P/Q-типа, а также от рианодиновых рецепторов.

Научно-практическая значимость работы.

Научно-практическая значимость проведенного исследования, прежде всего заключается в разработке экспериментального подхода, позволяющего оценивать пресинаптический уровень кальция в периферических синапсах теплокровных животных. В ходе исследования была разработана методика загрузки флуоресцентных красителей в двигательные терминали теплокровных животных через культуру нерва.

Научно-практическое значение результатов проведенного исследования заключается в получении новых данных о механизмах регуляции входа кальция в двигательные нервные окончания теплокровных животных за счет активации пресинаптических холинорецепторов.

Сопоставление результатов, полученных при помощи флуоресцентного метода, с данными электрофизиологических экспериментов указывает на то, что эффекты холинергических агентов на процесс квантового освобождения нейромедиатора связаны с изменениями входа Ca^{2+} в нервную терминаль. В целом, полученные знания помогут улучшить понимание молекулярных механизмов ауторегуляции секреции нейромедиатора в периферических синапсах. Основные выводы и результаты работы могут быть использованы в учебном процессе в рамках специализированных курсов для студентов, обучающихся по биологическим специальностям.

Апробация работы.

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах (международные библиографические базы Scopus, WoS и журналы рекомендованные ВАК).

Материалы работы представлены на: Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы» (Казань, 2015 и 2018 гг.), Российской с международным участием конференции по управлению движением «Motor Control 2016» (Казань, 2016 г.), XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием (Воронеж, 2017), 6-й европейской конференции о синапсах («6TH EUROPEAN SYNAPSE MEETING») (Милан, Италия, 2017 г.), конференции «Оптогенетика и оптофармакология» (Санкт-Петербург, 2018 г.), XIV Международной научной конференции, посвященной 80-летию Заслуженного деятеля науки РФ и РТ Ситдикова Фарита Габдулхаковича (Казань, 2018 г.), Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, 2019 г.).

Основное содержание работы отражено в следующих публикациях:

1. Samigullin, D. V. Calcium Transient Registration in Response to Single Stimulation and During Train of Pulses in Mouse Neuromuscular Junction / E.F. Khaziev, **N. V. Zhilyakov**, I.A. Sudakov, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Bionanoscience*. - 2016. - V. 7. - P. 1–5. (Scopus Q4, WoS Q4).
2. Samigullin, D. V. Calcium Transient and Quantal Release in Mouse Neuromuscular Junction Under Extracellular Calcium Concentration Change / **N. V. Zhilyakov**, E.F. Khaziev, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky // *Bionanoscience*. - 2018. - V. 8. - P. 984–987. (Scopus Q4, WoS Q4).
3. **Zhilyakov, N. V.** Changes in calcium levels in motor nerve endings in mice on activation of metabotropic cholinergic receptors and GABA receptors / E.F. Khaziev, A.R. Latfullin, A.I. Malomouzh, E.A. Bukharaeva, E.E. Nikolsky, D. V. Samigullin // *Neurosci. Behav. Physiol.* - 2019. - V. 49. - P. 1092–1095. (Scopus Q4)
4. **Zhilyakov, N.** Activation of neuronal nicotinic receptors inhibits acetylcholine release in the neuromuscular junction by increasing Ca^{2+} flux through Cav1 channels / A. Arkhipov, A. Malomouzh, D. Samigullin // *Int. J. Mol. Sci.* - 2021. - V. 22. (Scopus Q1, WoS Q1).

5. **Zhilyakov, N. V.** Registration of Calcium Transients in Mouse Neuromuscular Junction with High Temporal Resolution using Confocal Microscopy / A.Y. Arkhipov, E.F. Khaziev, M.A. Mukhamedyarov, D. V. Samigullin // J. Vis. Exp. - 2021. (Scopus Q2, WoS Q3).

Таким образом, требования по полноте опубликования основных научных результатов соблюдены.

Диссертационная работа Жилиякова Н.В. на тему «Роль холинорецепторов в регуляции кальциевого транзientа и освобождения нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе мышцы» несомненно является актуальной, обладает научной новизной, научно-практической значимостью, выполнена с использованием современных методов, имеет обоснованные положения и выводы, достоверность результатов подтверждается достаточным количеством данных, материал диссертационной работы изложен корректно и последовательно считаем, что данное исследование является завершенной научно-квалификационной работой.

Диссертационное исследование удовлетворяет всем требованиям раздела II «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук и рекомендуется к защите по специальностям 1.5.2. – «Биофизика» (биологические науки).

Заключение принято на расширенном научном семинаре отделов Медико-биологических исследований Клеточной сигнализации, Физиологии и молекулярной биологии растений (протокол № 1 от 11.10.2022 г.) и рекомендовано Ученому совету, с просьбой утвердить и выдать Заключение по диссертационной работе Жилиякову Н.В.. На заседании присутствовало 25 человек. Итоги голосования: «за»- 25 чел., «против»- нет, «воздержались» - нет.

Заключение рекомендовано к утверждению на заседании Ученого совета КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (протокол № 8 от 21.10.2022 г.). Из 15 членов списочного состава Ученого совета присутствовали 12 человек. Рекомендации и замечания, высказанные на научном семинаре, соискателем учтены, и соответствующие изменения внесены в текст диссертации. Итоги голосования: «за»- 12 чел., «против»- нет, «воздержались» - нет.

Руководитель Казанского института биохимии и биофизики – обособленного структурного подразделения ФГБУ «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»» д.б.н., профессор



Чернов В.М.

Председатель заседания научного семинара
к.б.н., с.н.с.

Ученый секретарь Казанского института
биохимии и биофизики – обособленного
структурного подразделения ФГБУ
«Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской
Академии наук», к.б.н.

С.И.
Маломуж А.И.
Подпись *А.И. Маломуж*
ЗАВЕРЯЮ
НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА ПРОТОКОЛ
И ДЕЛОПРОИЗВОДСТВА
«24» *2022* г.



И.Ю. Карпилова
Карпилова И.Ю.

Подпись *И.Ю. Карпилова*
ЗАВЕРЯЮ
НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА ПРОТОКОЛ
И ДЕЛОПРОИЗВОДСТВА
«24» *2022* г.

