

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени  
доктора биологических наук Гайдукова Александра Евгеньевича  
на тему «Участие пресинаптических входов ионов кальция в механизмах  
регуляции квантовой секреции нейротрансмиттера»  
по специальности 1.5.5 – «физиология человека и животных»**

### **Актуальность избранной темы**

Основной способ межнейронной коммуникации в нервной системе связан с химическим типом синаптической передачи, который опосредуется высвобождением молекул нейромедиатора из пресинаптических окончаний. Механизмы секреции нейромедиаторов в различных синаптических контактах в центральной и периферической нервной системе детально и всесторонне исследуются уже на протяжении нескольких десятилетий. К настоящему времени хорошо известно, что специфическим триггерным сигналом, запускающим процесс экзоцитоза синаптических везикул, является вход ионов кальция по определенным пресинаптическим потенциал-зависимым кальциевым каналам. Вместе с тем, появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что набор источников и спектр внутриклеточных кальциевых сигналов в нейронах и других клетках весьма разнообразен, однако роль этих дополнительных источников кальция в нервных терминалях в регуляции высвобождения нейромедиатора недостаточна ясна. Поэтому диссертационная работа Александра Евгеньевича Гайдукова, посвященная выявлению спектра регуляторных кальциевых входов, взаимодействующих с соответствующими им мишенями, и описанию их вклада в механизмы квантовой секрецией медиатора, безусловно, является актуальной для современной нейробиологии и физиологии синаптических процессов.

Актуальность проведенного исследования определяется также и тем, что проблемы, которым посвящена настоящая работа, имеют прикладное значение в связи с наличием ряда неврологических заболеваний, в основе которых лежат нарушения нервно-мышечной синаптической передачи. У людей известно множество патологических состояний, связаны с нарушениями нервно-мышечной передачи, в том числе вызванными мутациями более чем в 30 генах. Для многих из этих патологий доступные методы лечения далеко не совершенны. Возможности оптимизации лечения пациентов с этими заболеваниями зависят от понимания факторов, которые определяют эффективность функционирования нервно-мышечного синапса.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 308 страницах и включает традиционные разделы. Во введении (на 9 стр.) автор обосновывает актуальность исследования, формулирует его цель и задачи. В положениях, выносимых на защиту, четко сформулирована суть работы, и все 6 положений согласованы и объединены целью исследования. Отражен личный вклад автора и представлены сведения об апробации материалов диссертации и публикациях по теме исследования. Обзор литературы (78 стр.) включает большой объем сведений об источниках ионов кальция в пресинаптических терминалях, включая сведения о потенциал-зависимых кальциевых каналах, рианодиновых рецепторах и о двух типах лиганд-управляемых каналов - P2X7 рецепторах и никотиновых холинорецепторах альфа7-типа ( $\alpha 7$ -нХР). Обзор полно освещает современное состояние проблемы и место результатов диссертационного исследования в существующих представлениях о механизмах квантовой секреции медиатора. Обзор детальный, полный, однако вызывает сожаление отсутствие иллюстраций, которые могли бы помочь в восприятии излагаемых сведений. Методы исследования изложены на 10 страницах. Дано описание препарата диафрагмальной мышцы мыши, растворов и фармакологических агентов, оборудования для

электрофизиологических экспериментов, а также протоколов экспериментов и статистического анализа. Использованные методы адекватны поставленным задачам. Однако, к сожалению, этот раздел также не проиллюстрирован - нет фото или рисунка использованного препарата. Результаты работы и их обсуждение изложены на 125 страницах. Этот раздел хорошо структурирован, написан лаконично и четко. Согласно поставленным задачам, глава «Результаты и их обсуждение» разделяется на подглавы, соответствующие решаемым задачам. Большое количество рисунков (их 45), представляющих данные экспериментов, позволили автору логично и последовательно изложить результаты, несмотря на большой объем выполненных экспериментов и полученных данных. Каждый раздел сопровождается обсуждением результатов экспериментов и кратким заключением. Заключают текст диссертации «Выводы» и Список сокращений и литературы. Выводы, сделанные на основании полученных автором данных, обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Список литературы включает 650 источников и полностью соответствует ссылкам в тексте.

### **Степень научной новизны результатов и обоснованности основных положений диссертации, выносимых на защиту**

Имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о наличии в терминалях моторных синапсов многоуровневой кальций-зависимой системы тонкой настройки параметров секреции ацетилхолина, однако детали ее функционирования до конца не ясны. В работе А.Е. Гайдукова получены новые данные о вкладе разных источников поступления кальция в аксоплазму нервных терминалей моторных синапсов млекопитающих, о специфической роли этих пресинаптических кальциевых входов в управлении секрецией ацетилхолина по сравнению с триггерным входом, запускающим конечный акт выброса нейромедиатора. Автором раскрыты ранее неизвестные способы растормаживания медленных потенциал-

зависимых кальциевых каналов L-типа и роль этого процесса в регуляции секреции нейромедиатора. Приоритетный характер носит описанный в работе баланс воздействий, контролирующих статус кальциевых каналов L-типа: показано активирующее воздействие со стороны аденозиновых  $A_2$  рецепторов, протеинкиназы А и РКС и тормозные влияния со стороны аденозиновых  $A_1$  рецепторов, P2Y<sub>13</sub>-рецепторов АТФ, кальцинейрина и ВК-каналов. В работе впервые выявлены сигнальные каскады, следующие за входом ионов кальция по L-типу кальциевых каналов и облегчающие секрецию ацетилхолина с участием РКС и СаМКII. Новыми являются данные о том, что кальциевые -каналы L-типа облегчают вызванный выброс квантов ацетилхолина по механизму, отличному от лежащего в основе потенцирования секреции ацетилхолина при усилении кальциевого входа по триггерным кальциевым каналам P/Q-типа. В работе А.Е. Гайдукова впервые описано двунаправленное влияние на секрецию ацетилхолина выброса депонированного кальция через рианодиновые рецепторы. Показано, что направленность действия зависит от того, активируется ли эти рецепторы при входе кальция по P/Q- и L-типам кальциевых каналов или каналов  $\alpha 7$ -нХР.

Представляют большой интерес описанные автором условия активации пресинаптических  $\alpha 7$ -нХР экзогенным и эндогенным ацетилхолином или холином. В диссертационной работе впервые показано, что в моторных синапсах  $\alpha 7$ -нХР играют важную роль в системе ауторегуляции квантовой секреции ацетилхолина по принципу отрицательной обратной связи. Выявлено участие в этом процессе рианодиновых рецепторов, СаМКII и кальций-активируемых калиевых каналов SK-типа.

Автором впервые был проведен детальный электрофизиологический анализ роли в управлении секрецией медиатора входа кальция через ионотропные P2X<sub>7</sub>-рецепторы. Описаны условия их растормаживания и роль поступающим по ним ионов кальция в активации СаМКII и

растормаживании кальциевых каналов L-типа с последующим усилением вызванной секреции ацетилхолина.

В целом, проведенное исследование позволило охарактеризовать функциональную роль кальциевых сигналов, возникающих в моторных терминалях при активации различных путей. Показано, что в зависимости от источника кальция способен активировать либо локальные, либо частично перекрывающиеся кальций-зависимые сигнальные каскады и мишени, участвующие в регуляции секреции ацетилхолина.

Таким образом, содержащиеся в диссертационном исследовании положения, выводы и результаты раскрывают новые механизмы пресинаптической кальций-зависимой регуляции параметров секреции нейротрансмиттеров в химических синапсах. В целом, диссертантом получен обширный экспериментальный материал, анализ которого позволил автору прийти к открытию новых закономерностей функционирования нервно-мышечного синапса и роли входа ионов кальция в регуляции секреции медиатора.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертационное исследование А.Е.Гайдукова посвящено решению фундаментальной проблемы биофизики и физиологии синаптической передачи и безусловно имеет теоретическое значение для развития представлений о комплексной кальций-зависимой регуляции синаптических процессов на пресинаптическом уровне. В работе выявлен вклад четырех разных источников поступления кальция в аксоплазму нервных терминалей моторных синапсов и показана специфическая роль каждого из этих входов в регуляции определенных пресинаптических мишеней и параметров секреции медиатора.

Большую теоретическую и практическую значимость имеют выявленные в работе новые механизмы регуляции активности моторных синапсов с участием  $\alpha 7$ -нХР, SK-каналов, рианодиновых рецепторов, кальциевых каналов L-типа, CaMKII. В работе впервые показано, что

важную роль в системе ауторегуляции квантовой секреции ацетилхолина в моторных синапсах играют  $\alpha 7$ -нХР, которые осуществляют регуляцию секреторного процесса по принципу отрицательной обратной связи.

Полученные в диссертационной работе результаты могут иметь важное практическое значение при изучении механизмов изменений синаптической передачи при дисфункциях нервной системы и нервно-мышечной патологии. Полученные данные важны для разработки и тестирования лекарственных средств, направленных на коррекцию двигательных расстройств разного генеза.

### **Достоверность результатов исследования**

Достоверность полученных в работе результатов не вызывает сомнений. В диссертационном исследовании использованы классические электрофизиологические методы, адекватные поставленной цели. Для решения поставленных задач автор использовал микроэлектродные методы регистрации постсинаптических сигналов концевой пластинки в сочетании с применением широкого набора фармакологических инструментов для выявления специфических пресинаптических кальциевых входов, способов их регуляции, а также для анализа роли входа кальция по лиганд-управляемым ионным каналам. Схемы и протоколы экспериментов выстроены оптимально, исходя из задач исследования.

Научные положения и гипотезы, предложенные автором, объективны и обоснованы полученными результатами и опираются на глубокий анализ современных представлений о процессах, регулирующих пресинаптические функции. Все выводы и ключевые результаты основываются на статистически корректно обработанных данных.

В целом, анализ результатов позволяет заключить, что все выводы и положения, выносимые защиту, достоверны и обоснованы. Цель и все поставленные в диссертационном исследовании задачи полностью выполнены, что отражено в выводах работы.

Обоснованность исследования и оригинальность полученных результатов подтверждается публикацией материалов работы в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах (18 статей, из них 15 в журналах, индексируемых аналитической базой Web of Science). Результаты работы были представлены на авторитетных отечественных и международных конференциях и неоднократно обсуждены научным сообществом.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

Принципиальных замечаний к работе нет.

В порядке дискуссии хочу задать несколько вопросов:

1. Рассматривая физиологические механизмы регуляции высвобождения ацетилхолина автор не принимает во внимание появившиеся в последние годы данные о возможном влиянии на пресинаптические процессы активации перисинаптических Шванновских клеток как одного из участников процессов, модулирующих синаптическую передачу (Petrov et al., 2014; Noronha-Matos et al., 2020). Показано наличие на мембране Шванновской клетки как  $\alpha 7$  никотиновых холинорецепторов, так и P2X7 пуринорецепторов (Nobbio et al., 2009; Luo et al., 2013; Song et al., 2015). Допускает ли автор возможность того, что какие-то эффекты использовавшихся фармакологических препаратов могут быть связаны с их влиянием на рецепторы и сигнальные каскады не только в пресинаптическом окончании, но и на Шванновской клетке?

2. Могло ли оказывать влияние на исследовавшиеся параметры синаптической передачи некантовое высвобождение медиатора?

3. Автор допустил неточность, утверждая, что кальциевая проницаемость пуринорецепторов P2X7 выше, чем у других типов этих рецепторов (с. 172). Напротив, есть данные, свидетельствующие о том, что кальциевая проницаемость каналов этого типа рецепторов ниже, чем у других представителей этого семейства (He et al., 2003; Müller and Namasivayam, 2022). Однако следует отметить, что в силу того, что эти

рецепторы практически не десенситизируют при длительном воздействии агониста, можно ожидать, что суммарный вход кальция по этим каналам будет выше, чем при активации других типов рецепторов этого класса.

Высказанные замечания и вопросы не уменьшают отмеченное высокое качество работы и не ставят под сомнение полученные результаты, выводы и положения, выносимые на защиту.

### **Заключение**

Диссертационная работа А.Е. Гайдукова является актуальным, целостным исследованием, позволившим получить множество новых фактов, которые вносят существенный вклад в систему фундаментальных знаний о физиологии синаптической передачи. На основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения о роли ионов кальция в процессах синаптической коммуникации, совокупность которых можно рассматривать как основу нового научного направления в области фундаментальной и прикладной физиологии, нацеленного на изучение новых аспектов кальций-зависимой регуляции секреции медиаторов в химических синапсах. Диссертация имеет большое прикладное значение, поскольку содержит ряд ценных достижений, важных для понимания и коррекции двигательных расстройств различного генеза.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных» по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп.2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.



Таким образом, соискатель Гайдуков Александр Евгеньевич вполне заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 - «Физиология человека и животных».

31 марта 2023 г.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник

лаборатории функциональной синаптологии

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Научный центр неврологии» (г. Москва)

доктор биологических наук,

 **Шаронова Ирина Николаевна**

Контактные данные:

В.н.с., д.б.н. И.Н. Шаронова,

105064 Москва, переулок Обуха, 5, Институт мозга ФГБНУ НЦН,

Тел. раб. e-mail: : *irinashar@icn.fgbnu.ru*

Специальность, по которой защищена диссертация оппонентом:

03.03.06 – Нейробиология

Подпись, ученую степень Шароновой Ирины Николаевны заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ НЦН, к.м.н.

Д.В.Сергеев

*Подпись Шароновой И.Н.  
заверяю*

*д.ф.н. Л.А. Егоров*

*ведущий специалист по  
управлению персоналом*

