

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 темы исследования

Диссертационная работа А.Е.Гайдукова посвящена изучению молекулярных механизмов синаптической передачи в холинергическом нервно-мышечном синапсе. Актуальность исследования определяется, во-первых, важной функцией данного синапса, поскольку он опосредует всю произвольную моторику в организме. Нарушения в работе данного синапса лежат в основе таких распространенных и опасных заболеваний, как боковой амиотрофический склероз, различные мышечные дистрофии и миастенические синдромы. Поэтому данные, полученные в настоящей диссертационной работе, могут быть использованы при разработке новых подходов к лечению вышеуказанных заболеваний. Во-вторых, механизмы работы нервно-мышечного синапса во многом схожи с механизмами функционирования центральных синапсов, а, значит, знания, полученные на периферических синапсах, могут быть экстраполированы на синапсы центральной нервной системы, что имеет важное фундаментальное значение для понимания принципов работы нервной системы в целом.

Повышение концентрации ионов кальция в пресинаптической терминали во время генерации потенциала действия является ключевым моментом в механизме выброса медиатора и, таким образом, обеспечении процесса синаптической передачи. Поэтому понимание тонких механизмов регуляции уровня кальция в пресинаптической терминали является актуальной задачей современной физиологии. Помимо основного, достаточно хорошо изученного, триггерного входа кальция, связанного с активацией

потенциал-зависимых кальциевых каналов P/Q типа, в пресинаптической терминали существует еще ряд существенно менее исследованных путей входа ионов кальция – потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа, рианодиновые рецепторы эндоплазматического ретикулума, и два типа лиганд-управляемых каналов плазматической мембраны: пурино- и холино-рецепторы. Исследованию роли этих источников кальция в тонкой регуляции процессов синаптической передачи в нервно-мышечном соединении и посвящена диссертация А.Е.Гайдукова.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа изложена на 309 страницах и состоит из традиционных разделов. Во введении автор раскрывает актуальность работы, подробно описывая значение и роль ионов кальция в механизмах синаптической передачи. Список литературы включает 650 источников. Следует отметить, что список содержит лишь 7 русскоязычных работ, но при этом работы отечественных авторов, посвященные исследованиям механизмов синаптической передачи в нервно-мышечном синапсе, процитированы в достаточном количестве в англоязычных журналах.

В обзоре литературы подробно рассмотрена роль в процессе синаптической передачи всех молекулярных каскадов (потенциал-зависимые кальциевые каналы, различные ионо- и метаботропные рецепторы, протеинкиназы), активность которых исследуется в диссертационной работе. В главе «Материалы и методы исследования» приведено подробное описание электрофизиологического метода регистрации активности моторных синапсов – основного метода, с использованием которого выполнена работа. Подробно описан способ расчета квантовых параметров секреции медиатора, являющийся ключевым для анализа полученных в исследовании данных. Изложение результатов исследования совмещено с их обсуждением. На 45 иллюстрациях в графическом виде представлены результаты проведенных экспериментов. Практически для всех опытов приведены кривые изменения

амплитуды по времени и диаграммы, наглядно демонстрирующие изменение того или иного параметра. В «Заключении» приведена схема работы пресинаптической терминали, суммирующая все найденные в работе механизмы регуляции нервно-мышечной синаптической передачи.

Новизна полученных результатов, выводов и положений, выносимых на защиту

В процессе выполнения настоящей диссертационной работы был получен большой объем экспериментальных данных, значительно обогативших наши представления о молекулярных механизмах работы нервно-мышечного синапса. Впервые детально описаны механизмы двусторонней регуляции Ca^{2+} -каналов L-типа. Показано, что в «нормальных» условиях эти каналы находятся под постоянным тормозным контролем со стороны пуринорецепторов A1- и P2Y13-типов, а также активности кальций-зависимых калиевых каналов BK-типа. При этом каналы L-типа могут быть активированы вследствие запуска сигнальных каскадов с участием протеинкиназ A, C или CaMKII.

Впервые показан интересный механизм потенцирующего действия Ca^{2+} -каналов L-типа на высвобождение ацетилхолина: активация этих каналов приводит к увеличению пула медиатора, готового к выбросу, при этом не наблюдается увеличения вероятности выброса медиатора, что характеризует эффект активации «триггерных» кальциевых каналов P/Q типа.

В противоположность классической точке зрения о механизмах депрессии синапса при его длительной ритмической стимуляции – «утомлении» синаптического соединения вследствие истощения запасов медиатора, предложен принципиально иной механизм, участвующий в этом процессе: аутоингибирование выброса ацетилхолина, избыток которого в синаптической щели связывается с альфа-холинорецепторами, что, в свою очередь, приводит к активации калиевых каналов SK-типа, гиперполяризации мембраны и уменьшению количества активных зон в синапсе.

Впервые показана возможность двунаправленной регуляции синаптической передачи со стороны риаодиновых рецепторов эндоплазматического ретикулула: активация этих рецепторов со стороны потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа приводит к усилению выброса медиатора за счет возрастания пула везикул, готовых к выбросу, тогда как активация риаодиновых рецепторов посредством $\alpha 7$ -нХР, наоборот, снижает выброс.

Анализ содержания, степени достоверности и обоснованности результатов, выводов и положений, выносимых на защиту

Основным методическим подходом, примененным в данной работе, является сравнение функционирования нервно-мышечной синаптической передачи в контрольных условиях и в условиях применения фармакологических ингибиторов и активаторов различных внутриклеточных молекулярных мишеней. Диссертация в целом посвящена анализу роли четырех различных источников кальция в функционировании пресинаптической терминали нервно-мышечного синапса: потенциал-зависимым каналам L-типа, риаодиновым рецепторам, осуществляющим выброс ионов кальция из эндоплазматического ретикулула, и двум типам лиганд-управляемых каналов плазматической мембраны: пурино- и холинорецепторам.

В начале работы путем применения специфических ингибиторов Ca^{2+} -каналов L-типа автор убедительно демонстрирует, что данные каналы не активны в «нормальных» условиях функционирования синапса, но могут быть деблокированы путем применения специфического активатора каналов данного типа или блокаторами калиевых каналов (потенциал- и кальций-активируемых). В качестве доказательства этого вывода был проведен эксперимент, в котором предварительно апплицированный блокатор Ca^{2+} -каналов L-типа нитредипин препятствовал усилению нервно-мышечной передачи, вызванному применением блокатора ВК канала ибериотоксина. В

ходе проведения данных экспериментов выяснились интересные детали: увеличение секреции ацетилхолина, вызванное активацией кальциевых каналов P/Q и L типа, имеет разный механизм: в первом случае происходит увеличение вероятности выброса, тогда как при активации каналов L-типа происходит увеличение пула везикул, готовых к выбросу. Данный вывод следует из результатов обработки кривых ответов на высокочастотную ритмическую стимуляцию: размер пула везикул, готовых к выбросу, оценивали по скорости депрессии ответа в начальный период стимуляции. Данный метод является общеупотребимым, поэтому вывод о разном механизме активирующего действия кальциевых каналов P/Q и L типа является полностью обоснованным.

Дальше перед диссертантом встал вопрос: в чем причина того, что Ca^{2+} -каналов L-типа неактивны в нормальных условиях работы синапса? В моторных синапсах присутствует несколько возможных механизмов, обеспечивающих торможение синаптической передачи. В частности, это каскады, запускаемые активацией рецепторов к АТФ и аденозину, веществам, постоянно присутствующим в межклеточной среде, концентрация которых повышается во время активной работы нервных и мышечных клеток.

Было найдено, что блокатор A1 аденозиновых рецепторов DPCPX вызывает прирост амплитуды и квантового состава потенциала концевой пластинки (ПКП), из чего следует, что в нервно-мышечных синапсах A1-рецепторы находятся в постоянно активированном состоянии под действием эндогенного аденозина, что приводит к подавлению вызванной секреции АХ. Было также обнаружено, что эффект A1-рецепторов опосредуется через протеин киназу А (ПКА), поскольку специфический ингибитор ПКА снимает фасилитирующее действие DPCPX на нервно-мышечную передачу. Ну, и, наконец, было найдено, что конечным звеном, опосредующим влияние A1-рецепторов, являются Ca^{2+} -каналов L-типа, поскольку нитрендипин также препятствовал проявлению эффекта DPCPX. Таким образом, было

убедительно продемонстрировано, что одним из каскадов, поддерживающим Ca^{2+} -каналов L-типа в неактивном состоянии во время «нормальной» работы синапса, является система, запускаемая аденозиновыми A1 рецепторами.

Далее автор проверил еще одну тормозную систему, потенциально способную угнетать работу Ca^{2+} -каналов L-типа – пуринорецепторы P2Y13. Было показано, что селективный антагонист P2Y13 рецепторов увеличивает выброс ацетилхолина (АХ), что предотвращается блокированием Ca^{2+} -каналов L-типа нитредипином. Из этих экспериментов автор делает обоснованный вывод, что постоянная активация P2Y13 поддерживает Ca^{2+} -каналы L-типа в угнетенном состоянии во время «нормальных» условий функционирования нервно-мышечного синапса.

Кроме того, было найдено, что подавление активности кальцийнейрина увеличивает квантовый состав ПКП, что также блокируется нитредипином. При этом на фоне увеличенного блокатором кальцийнейрина выброса АХ добавление активатора Ca^{2+} -каналов L-типа не приводит к дальнейшему усилению синаптической передачи (окклюзия), из чего обоснованно делается вывод, что кальцийнейрин является еще одной системой, тормозящей активность Ca^{2+} -каналов L-типа. Схожие результаты были получены с другим пуринорецептором – P2Y13. Его селективный антагонист увеличивал выброс, что предотвращалось аппликацией нитрендипина.

При изучении молекулярных каскадов, которые могут опосредовать увеличение выброса АХ при активации Ca^{2+} -каналов L-типа, автор обнаружил, что при блокировании рианодинных рецепторов (РиР), обеспечивающих кальций-зависимый выброс кальция из эндоплазматического ретикулума, высокими концентрациями рианодина, полностью пропадает эффект специфических активаторов Ca^{2+} -каналов L-типа, а также ингибиторов ВК каналов (альтернативного способа активации L-каналов). Результаты этих экспериментов позволили автору сделать вывод

о том, что активация Р_иР рецепторов является промежуточным необходимым звеном в цепочке облегчающего действия Ca²⁺-каналов L-типа на выброс АХ.

Кроме вышеописанных механизмов, диссертанту удалось раскрыть еще несколько новых ранее неизвестных функций Р_иР рецепторов в процессах передачи в нервно-мышечном синапсе. Оказалось, что активация рианодиновых рецепторов (через некоторое время после аппликация рианодина в низкой концентрации) приводит к увеличению амплитуды ПКП, однако это увеличение реализуется за счет увеличения размера кванта при неизменном квантовом составе ответа. Пытаясь определить механизм, благодаря которому выброс депонированного кальция может приводить к увеличению размера кванта, автор провел эксперименты, в которых блокатор кальцитонин-ген родственного пептида (КГРП) предотвращал увеличение амплитуды МПКП, вызванное активацией рианодиновых рецепторов. Кроме того, активирующий эффект субмикромольных концентраций рианодина также снимался применением блокатора везикулярного транспорта АХ, который, по всей видимости, предотвращал накачку везикул дополнительными молекулами АХ и не допускал увеличения размера кванта. Исходя из этих результатов автор делает обоснованный вывод о том, что эффект активации рианодиновых рецепторов был опосредован выбросом из терминали кальцитонин-ген родственного пептида.

Далее диссертант рассматривает еще один малоизученный путь входа ионов кальция в пресинаптическую терминаль – ионотропные Р₂Х₇ рецепторы, лигандом к которым служит АТФ. Было найдено, что активаторы и блокаторы Р₂Х₇ рецепторов не приводят к изменениям в фоновой работе нервно-мышечного синапса, однако применение блокатора Р₂Х₇ препятствует растормаживанию передачи антагонист Р₂У₁₃-рецепторов. Из этих и последующих экспериментов делается изящный вывод о том, что в интактных моторных синапсах мышцы пресинаптические Р₂Х₇-рецепторы постоянно активированы эндогенной АТФ, но их потенцирующее действие на

выброс АХ замаскировано параллельной (и преобладающей) активностью других пуринорецепторов (в первую очередь - P2Y₁₃-типа).

Следующим изученным в работе источником ионов кальция в пресинаптической терминали стали альфа7-холинорецепторы ($\alpha 7$ -нХР). Во-первых, оказалось, что холин – естественный агонист альфа7-холинорецепторов, вызывает снижение квантового состава ПКП, что сопровождается, как показали расчеты, снижением размеров пула медиатора, готового к выбросу при неизменной вероятности выброса. Было высказано предположение, что эффект холина опосредуется активацией Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов SK-типа. Данное предположение было подтверждено в экспериментах, в которых блокатор SK-каналов апамин препятствовал эффекту холина снижать квантовый состав ПКП.

При дальнейшем исследовании роли $\alpha 7$ -нХР в функционировании нервно-мышечного синапса были раскрыты очень интересные детали, касающиеся способов его авторегуляции в условиях повышенной нагрузки. Оказалось, что депрессия синаптической передачи, развивающаяся при длительной высокочастотной ритмической стимуляции нерва, может быть существенно снижена применением специфического блокатора $\alpha 7$ -нХР. Исходя из полученных результатов автор делает очень интересный вывод о том, что при длительной интенсивной активности нервно-мышечного синапса выбрасывающийся АХ и его метаболит холин могут путем активации $\alpha 7$ -нХР и K⁺-каналов SK-типа снижать выброс медиатора, что является адаптивным механизмом, продлевающим работоспособность нервно-мышечного соединения.

В целом, внимательное изучение результатов диссертационной работы позволяет заключить, что все выводы и положения, выносимые на защиту, полностью достоверны и обоснованы. Все поставленные в начале работы цели и задачи полностью выполнены.

Оценка научной и практической значимости полученных результатов, выводов и ключевых положений диссертационной работы

Данная диссертационная работа посвящена исследованию клеточных и молекулярных механизмов синаптической передачи. В работе было получено значительное количество новых данных, позволивших предложить ряд новых функциональных схем, объясняющих функционирование нервно-мышечного соединения. Таким образом, полученные данные могут лечь в основу дальнейших фундаментальных исследований, направленных на раскрытие механизмов работы нервной системы. Традиционно, результаты фундаментальных исследований, подобных данным, могут быть использованы в педагогической практике для создания и корректировки учебных курсов студентов высших учебных заведений.

Важным практическим аспектом, в котором могут быть использованы результаты данного диссертационного исследования, является разработка новых подходов к лечению различных патологий, так или иначе затрагивающих нервно-мышечную передачу в частности и синаптическую передачу вообще. Здесь можно отметить такие заболевания, как боковой амиотрофический склероз, различные мышечные дистрофии и миастенические синдромы. Кроме того, поскольку долговременная модификация синаптической передачи лежит в основе процессов обучения и памяти, на основании полученных в диссертации данных можно пытаться создавать средства коррекции таких нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся нарушением синаптической передачи, как болезнь Альцгеймера.

Качество опубликованных работ по теме диссертационного исследования, степень участия автора

По материалам диссертации опубликовано 18 статей, из них 15 – в журналах, индексируемых международными базами данных, причем почти половина из них опубликована в журналах первого или второго квартиля (по

базе данных Scopus), что является очень хорошим показателем для работ подобного рода. В подавляющем большинстве статей А.Е.Гайдуков является первым или вторым автором, что свидетельствует о его значительном личном вкладе непосредственно в получение изложенных в работе данных.

Замечания и вопросы к содержанию диссертационной работы

В процессе прочтения работы у меня возникло несколько вопросов и замечаний, носящих исключительно дискуссионный характер.

Замечания

1. На мой взгляд, использование словосочетания «входы кальция» в значении «пути входа кальция» является лабораторным жаргонизмом, которого было бы лучше избежать, по крайней мере, в названии диссертации.

2. Как справедливо отмечает автор в разделе «Теоретическая и практическая значимость работы», «Результаты данной работы могут быть использованы при разработке новых подходов фармакологической коррекции работы моторных синапсов во время депрессии синаптической передачи или ее ослабления при патологиях различного генеза». Однако в обсуждении результатов работы данный аспект практически не затрагивается. Можно было бы предложить те или иные подходы к разработке новых стратегий лечения заболеваний, основываясь на механизмах работы нервно-мышечного синапса, обнаруженных в данной работе.

3. Одной из поразительных вещей, описанных в данной диссертационной работе, является противоположный (тормозный или активирующий), эффект активации одного и того же внутриклеточного процесса, например, выброса кальция из эндоплазматического ретикулума, на процесс синаптической передачи. По всей видимости, такое возможно благодаря существованию микродоменов внутри пресинаптической терминали, в которых сосредоточены сигнальные молекулы, задействованные в одном каскаде. Мне представляется, что это является важным аспектом диссертационной работы,

поэтому хотелось бы увидеть более четкое, выраженное и подробное обсуждение данного феномена с привлечением данных литературы.

4. Хотелось бы увидеть более широкое обсуждение возможной физиологической роли найденных молекулярных механизмов роли в работе синапса. Для некоторых исследованных механизмов это очень хорошо описано (например, для процесса ауторегуляции нервно-мышечного синапса с участием $\alpha 7$ -нХР), для других механизмов такого обсуждения нет.

5. Одним из факторов, определяющих актуальность данного исследования, является то, что данные, полученные на нервно-мышечных синапсах, могут быть экстраполированы на работу центральных синапсов и, таким образом, вносят значительный вклад в расширение наших общих представлений о работе мозга. В этой связи представляется уместным для каждого описанного молекулярного каскада проводить аналогии с известными из литературы механизмами работы центральных синапсов. Для некоторых разделов такое сравнение приведено (например, для кальциевых каналов L-типа), но не для всех.

Вопросы

1. Показано, что эффект блокаторов калиевых ВК-каналов ибериотоксина и паксилена полностью снимается предварительной блокадой кальциевых каналов L-типа. Применение ибериотоксина вызывает расширение потенциала действия в пресинаптической терминали, то есть увеличивается время, на протяжении которого мембрана находится в деполяризованном состоянии. Как автор объясняет то, что на такое удлинение периода деполяризации отреагировали потенциал-зависимые каналы только одного типа: L, но не P/Q?

2. Почему активация выброса депонированного кальция низкой концентрацией рианодина активировала только один описанный в диссертации молекулярный каскад (секрецию КГРП и вызванное ею

увеличение размера кванта медиатора), но не активировало другой каскад, связанный активацией калиевых SK-каналов и подавление секреции медиатора?

Заключение

Следует отметить, что высказанные замечания никаким образом не снижают актуальность и значимость проведенной автором работы и носят в основном дискуссионный характер. Таким образом, можно заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Гайдукова Александра Евгеньевича 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, а ее автор Гайдуков А.Е. заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.5 «физиология человека и животных».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор РАН,
директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской
академии наук

Малышев Алексей Юрьевич

5 апреля 2023 г.



Подпись Т. Малышева А.Ю.
Достоверно
Малышев А.Ю.
Донецкий В.Д.

Контактная информация:

Почтовый адрес: ИВНД и НФ РАН, Москва 117485, ул. Бутлерова, дом.5А

Тел.: E-mail: