

ОТЗЫВ официального оппонента
Снтдиковой Гузель Фаритовны
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 диссертационной работы.

Диссертационная работа Гайдукова Александра Евгеньевича посвящена актуальной проблеме нейрофизиологии – исследованию пресинаптических механизмов регуляции секреции нейромедиатора в синаптических структурах. Хорошо известно, что вход Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} каналы является триггером высвобождения нейромедиатора их пресинаптической области и опосредует процессы кратковременной и долговременной пластичности. Вместе с тем наличие других источников Ca^{2+} в пресинаптической терминали предполагает их участие в локальном повышении уровня Ca^{2+} и как следствие в регуляции секреции как в сторону облегчения, так и депрессии. Помимо потенциалзависимых Ca^{2+} каналов, являющихся основными триггерами входа Ca^{2+} в ответ на деполяризацию, на пресинаптических мембранах также экспрессируются другие типы потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов, ионотропные рецепторы, активирующиеся нейромедиатором или ко-медиатором, или продуктами их метаболизма. Кроме того, развитая система эндоплазматического ретикулаума может обеспечивать локальный Ca^{2+} вход и запускать работу внутриклеточных ферментов, активировать ионные каналы, регулирующие мембранный потенциал. Весь этот спектр влияний может осуществлять тонкую настройку синапса в зависимости от внешних и внутренних условий, кроме того, оказывать вклад в развитии патологических состояний. Динамика и роль внутриклеточного Ca^{2+} подробно описана в постсинаптических

структурах в ЦНС, тогда как в пресинаптических окончаниях пространственно-временная организация Ca^{2+} -сигналов, источники и мишени действия малоизучены. Исходя из вышесказанного актуальность работы не вызывает сомнения.

Научная польза проведенных исследований и полученных результатов.

При решении поставленных задач и реализации положений, выносимых на защиту, автором впервые были выявлены механизмы растормаживания медленных потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа и их роль в регуляции секреции ацетилхолина (АХ) при различной активности двигательного нерва. Показано, что облегчение секреции АХ при активации Ca^{2+} -каналов L-типа связано с возрастанием размера пула синаптических везикул, готовых к освобождению. Впервые показана роль Ca-активируемых K каналов большой проводимости (BK-каналов), тонически ингибирующих Ca^{2+} -каналы L-типа, а блокирование BK каналов приводит к активации L-тип Ca^{2+} -каналов и выбросу Ca из Ca депо через рианодиновые рецепторы (РиР). Одно из последствий активации РиР – это Ca^{2+} /CaMKII-зависимое освобождение кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) и увеличение размера кванта медиатора. Выявлены протеникиназы, активирующие L-тип Ca^{2+} -каналов – PKA и PKC и фосфатаза – кальцийнейрин – тонически их ингибирующая. Активность этих внутриклеточных ферментов регулируется рецепторами аденозина – A2A-типа, A1 типа, АТФ – P2Y13. Кроме того, впервые показали, что активация P2X7 рецепторов является необходимым условием для растормаживания L-тип Ca^{2+} -каналов при снижении ингибиторного влияния P2Y13 рецепторов. Наконец, впервые описаны условия активации пресинаптических $\alpha 7$ -нХР АХ/холином, что приводит к аутоингибированию вызванного освобождения АХ по механизму обратной отрицательной связи с участием РиР, CaMKII и SK-каналов.

Теоретическая и практическая значимость.

Диссертация Гайдукова А.Е. имеет важное теоретическое значение, так вносит вклад в фундаментальные представления о механизмах пресинаптической регуляции нервно-мышечной передачи. В работе показана и раскрыта роль различных источников ионов Ca^{2+} в нервном окончании помимо триггерных P/Q-тип Ca^{2+} -каналов и включающих L-тип Ca^{2+} -каналов, RиР , P2X7 -рецепторам и $\alpha7$ -нХР. Выявлены условия активации, эффекты и внутриклеточные мишени действия каждого Ca^{2+} входа на такие параметры секреции как амплитуда миниатюрных и вызванных концевой пластинки (ПКП), квантовый состав потенциалов концевой пластинки (ПКП) и его изменения по ходу короткой и длительной стимуляции, размер одиночных квантов АХ. Научная ценность работы связана с тем, что полученные данные служат основой для создания модели комплексных Ca^{2+} -зависимых пресинаптических взаимодействий, осуществляющих тонкую настройку работы синапса при различных формах активности. Гайдуковым А.Е. сформулировано представление о компартиментализации локального повышения уровня Ca^{2+} и внутриклеточных мишеней действия, позволяющих обеспечить избирательность регуляции отдельных процессов. Представлена новая модель, согласно которой активация одних и тех же мишеней может приводить к различным эффектам в зависимости от их путей активации.

Работа имеет практическое значение, так как открывает возможности для разработки новых фармакологических подходов для коррекции нарушений работы моторного синапса.

Структура и содержание работы

Диссертация Александра Евгеньевича изложена на 309 страницах, построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты

и обсуждение, заключение и выводы. Список литературы включает 650 источников. Работа хорошо иллюстрирована, присутствует 45 рисунков.

Во введении автор аргументировано обосновывает выбор темы исследования, представляет степень разработанности темы, описывает цель и задачи исследования, кроме того, здесь обозначены научная новизна и научно-практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, также отражены апробация материалов диссертации, публикации, структура и объем диссертации.

Обзор литературы изложен на 77 страницах и включает сведения о специфических свойствах четырех разных путей поступления ионов Ca^{2+} в аксоплазму нервных терминалей (Ca^{2+} -входов) и их избирательном участии в регуляции секреции в центральных и периферических синапсах. Первый раздел посвящен потенциалзависимым Ca^{2+} -каналам (CaV -каналам). Рассмотрены классификации каналов в зависимости от их функциональных свойств и субъединичного состава. Подробно описано молекулярное строение и субъединицы Ca^{2+} каналов. Далее автор подробно знакомит с ролью Ca_v каналов в процессах экзоцитоза синаптических везикул, путями регуляции P/Q типа Ca^{2+} каналов в активной зоне: белками SNARE-комплекса: Ca-связывающими белками, прежде всего CaM; β -субъединицами G-белка в ответ на активацию пресинаптических метаболотропных Gi-белок-сцепленных аденозиновых A1- и A3-рецепторов, пуриновых P2Y13-рецепторов и мускариновых M2-рецепторов; протеинкиназами. Далее анализируется структура и работа отдельных активных зон в моторных синапсах теплокровных и приводятся данные о количественном анализе размера RRP, вероятности секреции в отдельной активной зоне. Описана роль BK каналов в регуляции экзоцитоза за счет их влияния на пресинаптический ПД и входящий Ca^{2+} ток. Отдельно описаны L-тип Ca^{2+} -каналов: особенности их экспрессии, кинетики, регуляции, роли в пресинаптических структурах, и в частности, в двигательном нервном окончании. Литературные данные свидетельствуют о возможности

регуляции L-тип Ca^{2+} -каналов со стороны метаботропных мускариновых и аденозиновых рецепторов в нервно-мышечных синапсах. Исходя из уже известных данных автором были поставлены закономерные вопросы о роли L-тип Ca^{2+} -каналов в регуляции секреции при ритмической, физиологической активности синапса.

Второй раздел обзора литературы посвящен РнР эндоплазматического ретикулума (ЭР): структуре, локализации, особенностям активации и внутриклеточной регуляции с помощью протеинкиназ и фосфатаз. Отдельно обсуждается роль РнР пре- и постсинаптических структур ЦНС в развитии синаптической пластичности; а также влияние РнР на нервно-мышечную передачу. Несмотря на значительный объем уже опубликованных данных, автором были поставлены вопросы о вкладе депонированного Ca^{2+} и РнР в регуляцию размера кванта и секрецию АХ при различных режимах работы синапса.

Третий раздел посвящён рецепторам пуринов и особенно P2X7, активация которых приводит к формированию значительной поры в мембране и соответственно высокой проводимости для ионов Ca^{2+} . В моторных синапсах роль P2X7 рецепторов практически не изучена.

Четвертый раздел обзора посвящен пресинаптическим никотиновым холинорецепторам $\alpha 7$ -типа. В данном разделе охарактеризованы структура и типы nXP, особенности нейрональных $\alpha 7$ -nXP и представлены данные о роли этих рецепторов в регуляции нервно-мышечной передачи.

В заключение обзора представлены основные концепции, существующие на сегодняшний день о механизмах пластичности в моторных синапсах, факторах регулирующих размер и восполнение RRP при ритмической активности синапса и с учётом современного состояния проблемы кратковременной синаптической пластичности обоснованы цели и задачи исследования.

В главе «Материалы и методы» очень подробно описана методика, отражены протоколы экспериментов, анализ результатов и статистический

анализ полученных данных. В работе использовался электрофизиологический метод регистрации потенциалов концевой пластинки (ПКП) в изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы. Для устранения мышечного сокращения использовали метод рассечения мышечных волокон. Регистрировали спонтанные (мПКП) и одиночные и вызванные ритмической стимуляцией (50 Гц) ПКП. Кроме того, проводился расчет квантовых параметров секреции АХ, оценивался размер пула готовых к выбросу везикул (RRP) и вероятность выброса квантов АХ (p) согласно модели Ruiz et al., 2011. Статистическая обработка результатов соответствует общепринятым стандартам.

В главе «Результаты и обсуждение» последовательно приведены результаты экспериментальных исследований и их обсуждение, интерпретация и сопоставление с имеющимися данными в мировой литературе. В первой части анализируется роль L-тип Ca^{2+} -каналов в регуляции квантовой секреции АХ. С использованием различных блокаторов было выявлено «молчание» этого типа Ca^{2+} -каналов при обычных режимах стимуляции, что соответствует литературным данным. Однако, активация L-тип Ca^{2+} -каналов вызывало значительный прирост КС ПКП как при одиночной, так и ритмической стимуляции вследствие увеличения размера RRP, но не вероятности выброса квантов (p). Анализ роли различных типов К каналов в «растормживании» L-тип Ca^{2+} -каналов выявил участие ВК каналов этом процессе.

Далее анализировали вклад Ca^{2+} -зависимых ферментов – таких как РКС и/или СаМКII в эффектах растормаживания L-тип Ca^{2+} -каналов, который показал специфическое увеличение активности исследуемых киназ в результате входа Ca^{2+} по L-тип Ca^{2+} -каналов.

В следующем разделе приведены результаты исследований, направленных на выявление путей подавления или активации L-тип Ca^{2+} -каналов, связанных с активностью пуриновых рецепторов АТФ и аденозина и фосфатаз. Оказалось, активация как А1 рецепторов аденозина, так и P2Y13-

рецепторов АТФ оказывает тормозное влияние на L-тип Ca^{2+} -каналов за счет ингибиторного влияния на аденилатциклазу, и как следствие активность ПКА. Кроме того, кальцинейрин (CaN) - активируемая Ca^{2+} /CaM серин-треониновая фосфатаза оказывает тоническое тормозное действие на L-тип Ca^{2+} -каналов. Таким образом, автором впервые показано, что наличие баланса разнонаправленных воздействий на L-тип Ca^{2+} -каналов за счет активности ПКА и фосфатазы CaN. Действительно, избирательная активация А2А рецепторов аденозина приводила к растормаживанию L-тип Ca^{2+} -каналов за счет активации ПКА.

Следующий раздел результатов связан с анализом роли риаодиновых рецепторов в регуляции квантовой секреции медиатора при активации различных Ca входов. Первое интересное открытие автора было связано с увеличением амплитуды МПКП при активации РнР риаодином в низких концентрациях и было предположено, что этот эффект связан с действием пептида КГРП, ранее показанного в нервно-мышечном синапсе холоднокровных. Действительно, экзогенные изоформы пептида КГРП человека и крысы приводили к повышению амплитуды МПКП, что связано с повышением размера кванта АХ. Автором впервые показано, что секреция эндогенного КГРП вызывается выбросом депонированного Ca^{2+} через РнР при их активации входом Ca^{2+} через P/Q тип Ca^{2+} каналы и активацией CaMKII. КГРП, в свою очередь, действуя аутокринно на свои пресинаптические рецепторы, вызывает ПКА зависимое возрастание размера квантов. Во-вторых, впервые показано, что вход Ca через L-тип Ca^{2+} -каналов также приводит к активации РнР, в результате чего происходит повышение КС ПКП вследствие возрастания размера RRP. В целом эти два источника Ca^{2+} , вызывающие выброс Ca^{2+} из депо, повышают фактор надежности нервно-мышечной передачи.

Третий блок результатов связан с описанием Ca^{2+} входа через ионотропные рецепторы к АТФ – P2X7. Возможность регуляции секреции АХ при ритмической стимуляции рецепторами P2X7 была сначала

подтверждена с использованием экзогенного агониста и антагониста в присутствии быстрого или медленного буферов Ca^{2+} . Затем автору впервые удалось показать участие P2X7 рецепторов в сигнальном каскаде, вовлекающим L-тип Ca^{2+} -каналов в результате активации CaMKII, при отсутствии тормозного влияния другого пуринового рецептора P2Y13.

Четвертый раздел результатов посвящен роли Ca^{2+} входа по каналам $\alpha 7$ -нХР, для активации которых использовали холин. В отличие от центральных синапсов активация $\alpha 7$ -нХР эндогенными АХ/холином в моторных синапсах вызывает торможение секреции АХ. Действительно, холин вызывал угнетение КС ПКП при одиночной и ритмической стимуляции. Для объяснения подавления секреции в ответ на Ca^{2+} вход через $\alpha 7$ -нХР была предложена гипотеза об активации SK каналов и PnP , приводящей к гиперполяризации мембраны и снижению размера RRP. В результате использования соответствующих антагонистов было впервые установлено, что активация $\alpha 7$ -нХР тормозит синаптическую передачу в моторных синапсах посредством запуска внутриклеточного каскада с участием рианодин-чувствительных Ca^{2+} -депо, CaMKII и Ca^{2+} -активируемых SK-каналов. При этом ингибирование $\alpha 7$ -нХР SK каналов и PnP снижали депрессию КС ПКП в условиях длительной тетанической активности синапсов (50 Гц, 40 секунд). Таким образом, в работе впервые показана физиологическая роль $\alpha 7$ -нХР, обеспечивающего пресинаптическое аутоингибирование выброса АХ по принципу отрицательной обратной связи.

Раздел «Заключение» включает обобщение полученных результатов, сравнение с литературными данными и итоговую схему, описывающую роль каждого из рассматриваемых источников Ca^{2+} в регуляции Ca^{2+} -зависимой секреции АХ. Изложение и интерпретация представленных материалов обосновывает положения диссертации, выносимые на защиту, и логически подводит к выводам работы.

Выводы диссертации обоснованы результатами исследования и соответствуют решению поставленных задач.

В целом надо отметить хороший литературный слог, практически отсутствие опечаток, высокое качество иллюстративного материала, логичность изложения, когда каждый новый раздел обосновывается результатами предыдущего.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, результатов и выводов.

Все использованные в работе объекты и методы, включая статистические методы обработки результатов, выбраны корректно. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения.

Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно.

Диссертационное исследование по своему содержанию соответствует заявленной специальности 03.03.01 – «Физиология».

Основные идеи и положения диссертационной работы отражены в научных публикациях. По теме исследования опубликованы 18 статей (из них 15 в рецензируемых журналах, индексируемых аналитической базой Web of Science, Scopus и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.015.7 по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных) и 27 тезисов в сборниках докладов научных конференций. Публикации полностью соответствуют теме диссертационного исследования и раскрывают его основные положения.

Автореферат соответствует всем требованиям, предъявляемым к подобным работам, дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертации.

Вопросы и замечания.

При ознакомлении и анализе материалов, изложенных в диссертации, возник ряд вопросов и замечаний.

Замечание. Некоторые части обзора литературы являются избыточными (например подробное описание типов потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов), тогда как отсутствует информация о роли КГРП в регуляции нервно-

мышечной передачи; а также об изменении размера кванта медиатора как способа регуляции секреции.

Вопросы

1. Почему активация ВК каналов не влияет на активность Ca^{2+} каналов P/Q типа в связи с ко-локализацией этих белков, тогда как активации SK каналов (через $\alpha 7$ -nAChR), имеющих более низкую проводимость, вызывает угнетение секреции?
2. Как Вы можете прокомментировать результаты недавних исследований, показавших, что угнетение освобождения медиатора, вызванное активацией пресинаптических никотиновых рецепторов, не связано с активацией SK каналов (Zhilyakov et al., 2021)?
3. В работе было показано, что активация РнР увеличивает амплитуду МПКП и размер кванта за счет CaMKII зависимого выброса КГРП. Какие эндогенные механизмы активации РнР приводят к таким последствиям? Имеются ли подобные примеры в литературе о связи РнР с освобождением электроплотных везикул?
4. Какие рецепторы КГРП присутствуют на пресинаптической мембране, активация которых ведет к активации PKA? Известно ли, какие эндогенные концентрации КГРП могут обнаруживаться в синаптической щели и можно ли доказать эндогенное действие КГРП. Имеется ли вклад постсинаптических рецепторов КГРП в его эффекты?
5. В работе справедливо отмечается разнообразие процессов, в которых участвует РнР опосредованный выброс депонированного Ca^{2+} . Как все таки можно объяснить отсутствие эффектов активации РнР на размер кванта в случае растормаживания Ca^{2+} каналов L-типа?
6. Кальцийнейрин – один из факторов, тормозящих L-тип Ca^{2+} каналов. Какие сигналы эндогенно регулируют активность кальцийнейрина?
7. Интересные данные были получены о роли P2X7 рецепторов в процессах регуляции секреции. При этом для активации этих рецепторов необходимо высокие концентрации АТФ, а V_zАТФ не является

специфическим агонистом и может активировать другие рецепторы АТФ. Может ли этот тип рецепторов оказывать вклад в секрецию при нормальных физиологических условиях? При каких состояниях P2X7 рецепторы могут включаться в регуляцию?

8. Диафрагмальная мышца состоит из разного типа мышечных волокон по фенотипу и метаболизму. Есть ли отличия в процессах синаптической пластичности и ее регуляции, обнаруженные в Ваших исследованиях, в разных типах волокон?
9. Оказывают ли вклад в поддержание секреции при кратковременной и долговременной стимуляции процессы восполнения RRP и процессы эндолитоза синаптических везикул? Могут ли обнаруженные Вами сигнальные системы влиять на процессы рециклирования?

Заключение о соответствии диссертации предъявляемым требованиям

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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».

●официальный оппонент:

Ситдикова Гузель Фаритовна

Доктор биологических наук, профессор

Заведующий кафедрой физиологии человека и животных ИФМиБ ФГАОУ
ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет".

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.00.13 Физиология

Адрес: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д. 18, Казанский федеральный
университет, Институт фундаментальной медицины и биологии

Тел.

Адрес электронной почты:

«13» марта 2023 года

Г.Ф. Ситдикова

Подпись Г.Ф. Ситдиковой заверяю

ВЕДУЩИЙ ДОКУМЕНТОВЕД

Ситдикова Г.Ф.

Заринаева Д.В.

14.05.2023

