

#### ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Петрова Алексея Михайловича, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02. – биофизика и 03.03.01 – физиология, на тему «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний»

Диссертационная работа Алексея Михайловича Петрова посвящена проблеме, которая на протяжении времени своего существования претерпела смену самых разных толкований. Холестерин был получен как химическое соединение еще в конце 18-ого века. Внимание к его возможной биологической роли было привлечено обнаружением его накопления в интима кровеносных сосудов и тем самым вовлеченности в патогенез атеросклероза. Отсюда возник интерес к обмену холестерина, к причинам значительных колебаний его содержания в крови, возможности диетического влияния на этот процесс с целью предотвращения атеросклероза. Эта сторона изучения биологической роли холестерина со временем подверглась существенному пересмотру и появилось ясное понимание того, что холестерин это не «враг», с присутствием которого следует бороться, а непременный компонент мембранных структур, обладающий важными функциями.

Попутно возрастал интерес к общеизвестной репутации холестерина как относительно мало специфичного стабилизатора текучести плазматических мембран, способного ограничивать латеральную подвижность ее белковых компонентов. Наряду с этим в последние 20-30 лет с нарастающим темпом накапливаются сведения о специфических функциях холестерина, о функционально значимом распределении его содержания в разных тканях, о роли разнообразной структурной и функциональной роли липопротеинов, одним из важных компонентов которых является холестерин, о микроструктуре вовлеченности холестерина в организацию биологических мембран специализированных клеток и, наконец, о подчас неожиданной способности холестерина взаимодействовать с конкретными белками, модифицируя их функциональные свойства.

Диссертационная работа после необходимого вступления открывается обширным квалифицированным литературным обзором, являющимся ее важным компонентом. Обзор посвящен критическому рассмотрению современного состояния двух ключевых для проведенного исследования проблем. Во-первых, это совокупность сведений о функциональной организации одного из важнейших для нервной системы процессов – управляемой секреции медиаторов. Начиная с сороковых годов прошлого столетия, опубликованы результаты тысяч исследований, посвященных структурам и механизмам,

реализующим эти процессы. Основное внимание в обзоре уделено структуре и морфологическим превращениям синаптических везикул, белковой машине секреции (экзоцитозу), судьбе везикулярных мембран, вовлекаемых в процессы эндоцитоза, и многочисленным путям регуляции всего цикла в целом. Обзор достаточно подробно и в то же время обобщено излагает данные 483 источников и свидетельствует о прекрасном знании диссертантом современного состояния исследуемых проблем.

Проведенные исследования направлены на выяснение роли холестерина в комплексе процессов, осуществляющих одну из важнейших функций нервной системы – синаптическую передачу. Таким образом актуальность этой задачи не вызывает сомнения. Преобладающим методическим разном объеме подходом в этом обширном и многоплановом исследовании выступает удаление разного объема холестерина из мембран клеток, непосредственно участвующих в синаптической передаче. К исследованию последствий такого действия привлекается широкий арсенал методических приемов.

Перечень использованных диссертантом подходов и методов отвечает самым современным требованиям к исследованиям подобного рода. Это количественная идентификация холестерина, модификации холестерина путем энзиматического окисления, исследование действия его продуктов, применение воздействий, влияющих прямо или косвенно на метаболические превращения холестерина. В качестве объекта исследований обосновано избраны нервно-мышечные синапсы мышей и крыс. Методические приемы, позволяющие количественные оценки структурных и функциональных эффектов этого обширного набора воздействий можно свести в две группы. К первой относятся различные модификации электрофизиологических регистраций вызванной, спонтанной и невезикулярной секреции ацетилхолина из двигательных нервных окончаний. Вторую группу составляют флуоресцентные подходы, позволяющие с помощью набора избирательных красителей количественно отслеживать их сорбцию и десорбцию из конкретных участков вне- и внутрисинаптических мембран. В первую очередь это касается везикулярных процессов экто- и эндоцитоза.

Специфические красители применялись также для измерения уровня концентрации кальция в цитозоле нервного окончания, концентрации внеклеточного ацетилхолина в перфузате, содержавшем фрагмент мышечного препарата, внеклеточной концентрации пероксида водорода. Проводилась идентификация в мембранах самого холестерина и его окисленных форм, внутриклеточного pH, перекисного окисления липидов, изменений фазовых свойств мембран. Привлекались методы иммунохимии при использовании

антител к синтаксину и синаптофизину. В целом арсенал методов хорошо продуман и вполне адекватен целям и конкретным задачам исследований.

#### Оценка содержания работы и результатов, степени их обоснованности и достоверности.

Одной из наиболее важных задач проведенного исследования можно считать изучение связи между функционированием синаптических везикул и липидными компонентами их мембраны. В ходе решения этой задачи исследовано распределение холестерина и скоплений ганглиозидов GM1 в синаптических мембранах, которое позволило впервые выявить липидные микродомены - *липидные плотики* в области скопления синаптических везикул, и определить их количественное представительство в везикулах, находящихся на разных этапах функционального везикулярного цикла. Имеющиеся сведения об этих процессах существенно пополнились, появилась возможность построения ряда новых схем функционального участия этих липидных компонентов. Разработанная в лаборатории система применения флуоресцентных красителей, различающихся по способности проникать через мембрану клетки и по сорбционной способности к разным ее компонентам, позволила предложить критерии различения везикул, принадлежащих разным пулам и обладающих разной степенью готовности к экзоцитозу. Эта схема применялась в совокупности с приемами, позволяющими влиять на содержание холестерина.

Корреляция между содержанием холестерина и скоплениями ганглиозидов GM1 в липидных плотиках в мембране прямо указывает на значимость холестерина для функциональных превращений синаптических везикул. Это представление послужило основой для большой серии экспериментов, большинство из которых являются оригинальными, так же, как и модификации методов их проведения. Прямым и убедительным подходом в части этих экспериментов представляется комбинация воздействия метил- $\beta$ -циклодекстрином (МЦД), агентом, способным удалять холестерин из плазматических мембран, в сочетании с оценкой этой убыли с помощью окрашивания препаратов филипином III, и с последующей попыткой восстановления прежнего уровня действием растворимого комплекса - МЦД+холестерина. Исследования последствий действия МЦД были проведены с помощью целого ряда дополнительных подходов с применением флуоресцентных и электрофизиологических методов.

Обнаружена существенная зависимость эффекта МЦД от концентрации, длительности воздействия и частоты стимуляции нервной терминали. Действие МЦД, начиная с 1 мМ, приводило к удалению примерно 20% холестерина синаптических мембран и снижало интенсивность окрашивания меткой на липидные рафты. При этом снижался квантовый состав ТКП, но оставались практически неизменными параметры

спонтанной секреции, что трактуется как признак необходимого присутствия холестерина в первую очередь для сохранения вызванной секреции, В пользу этого говорят литературные данные о прямых связях с холестерином синтаксина 1А и  $Ca^{2+}$ -каналов P/Q-типа, а также результаты, полученные автором о том, что удаление существенных количеств холестерина при действии высокой концентрации (15 мМ МЦД) приводит к нарушению правильного распределения белка активных зон синапсина 1, что может указывать на их дезорганизацию.

Ситуация с трактовкой обнаруженного влияния МЦД на спонтанное освобождение представляется более сложной. Действие 10 мМ МЦД вызывает значительный рост частоты МПКП, это происходит на фоне снижения холестерина на 20% и сопровождается увеличением концентрации цитозольного кальция на 17%. В этих условиях применение внутриклеточного хелатора Са – ВАРТА-АМ - понижает как уровень Са, так и частоту МПКП. Снижение частоты МПКП могло быть достигнуто также воздействием комплексом холестерин-МЦД, т.е. реституцией наличия холестерина. Таким образом, представляется неоспоримым, что снижение концентрации холестерина при действии МЦД, приводит к изменению кальциевого гомеостаза пресинаптической терминали и неизбежно должно сказаться на сложном взаимодействии процессов экзо- и эндоцитоза. Тогда возникает следующий вопрос о механизме этого нарушения, о путях проникновения кальция в терминаль или освобождения его из ретикулума.

При анализе этого феномена автор приложил наибольшие усилия для выявления возможных внутриклеточных последствий МЦД. Среди них было повышение концентрации активных форм кислорода (АФК), затем был измерен рост внеклеточной концентрации  $H_2O_2$ , как возможного индуктора этого повышения, и возможность добиться с помощью антиоксиданта частичного снижения частоты МПКП. Результаты этих экспериментов послужили основой для гипотезы о том, что АФК запускает цепь событий, приводящих к активации некоего канала/каналов, проводящих ионы кальция внутрь терминали. Блокатор кальциевых каналов нифедипин не изменял цитозольную концентрацию кальция. Возможное участие Са, освобожденного из ретикулума, также было поставлено под сомнение. Тогда подозрение пало на TRPV1 каналы пресинаптической мембраны, которых в ней, как оказалось, действительно, много. Было показано, что блокатор TRPV1 каналов капсазепин существенно подавлял кальциевый сигнал. Так возникла схема: НАДФН-оксидаза / активные формы кислорода (АФК) / TRPV-каналы /  $Ca^{2+}$ . На самом деле схема была в дальнейшем усложнена, поскольку было выявлен кальциеврин-зависимый механизм усиления спонтанного экзоцитоза,

возникающего при удалении значительной части мембранного холестерина. К тому же было обнаружена роль фосфорилирования с участием протеинкиназы С.

Выявление компонентов этой схемы с использованием контролей их возможного участия на каждом из этапов потребовала большой экспериментальной работы. Здесь есть пионерские находки и подтверждения пока еще малоизвестных данных. Ее ценность не вызывает сомнений. Однако для окончательного суждения о механизме повышения цитозольного Са в результате удаления части холестерина из синаптических мембран, хотелось бы видеть также результаты контрольных опытов, в которых механизм усиления спонтанного освобождения исследовался с применением хотя бы части перечисленных выше подходов, но которое вызывалось бы не удалением холестерина, а другими более простыми и классическими способами – повышением наружного калия, деполяризацией нервного окончания, ионофорами и т. п. Это бы подтвердило или отвергло предположение об «особости» повышения спонтанного освобождения, зависящего от убыли холестерина, по сравнению с хорошо известным эффектом деполяризации нервной терминали.

Интересный раздел диссертации посвящен исследованию влияния ферментативного окисления холестерина и продуктов этого процесса на везикулярный цикл в нервно-мышечных синапсах лягушки. Его целью была, по-видимому, попытка показать, что изменения в состоянии липидных плотиков и обусловленные ими нарушения экзо- и эндоцитоза, которые были обнаружены при вымывании холестерина с помощью МПЦ, можно воспроизвести иным путем, а именно, влияя на метаболизм холестерина. Представляется, что качественно эта попытка удалась, однако степень выраженности изменений оказалась невысокой. Воздействие бактериальной холестерин-оксидазой выявило изменения в состоянии липидных плотиков, которые сопровождалась некоторыми нарушениями вызванного экзоцитоза синаптических везикул только при интенсивной стимуляции, но не затрагивало процесс спонтанного экзоцитоза. Целесообразность дальнейшего развития этого подхода несомненна и подкрепляется тем, что существует ряд патологических процессов, в механизмы которых включаются нарушения метаболических превращений холестерина в биологических мембранах,

Один из разделов диссертации посвящен зависимости интенсивности транспорта некантового (в диссертации используется термин – невезикулярного) ацетилхолина (АХ). Показано, что частичное удаление холестерина, вызванное МПЦ, увеличивает амплитуду Н-эффекта, что может быть устранено действием ингибитором переносчика АХ везамикола. Проведенные исследования позволяют предполагать, что наличие нормальной концентрации холестерина в пресинаптической и везикулярной мембранах предотвращает чрезмерное некантовое освобождение АХ. Предлагаемое объяснение

механизмов некантового освобождения АХ усложнено тем, что в него включено закисление аксоплазмы. Этот процесс исследовался с помощью применения рН-зависимого флюоресцирующего красителя.

#### Новизна и научно-практическая значимость.

Новизна проведенного исследования достаточно высока. Это касается практически всех разделов работы, начиная с подбора методов и осуществления их модификаций. Обнаружено значительное число новых фактов, позволивших предложить ряд новых функциональных схем, которые либо представляют собой четко сформулированные гипотезы, либо должны явиться предметом дальнейшей разработки. Полученные новые данные полезны при детальном анализе ряда заболеваний нервной системы, поскольку существуют сведения об участии изменений функции холестерина в их патогенезе.

Степень освещения результатов работы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК вполне достаточна. Они послужили предметом публикации 15 статей в авторитетных журналах. В том числе статьи в таких высоко рейтинговых журналах как Journal of Neuroscience, J. of Physiology, Neuroscience и др. Материалы работы были заслушаны в качестве докладов на значительном числе научных съездов и конференций.

#### Вопросы, возникшие при анализе диссертационной работы.

1. Наиболее дискуссионным представляется вопрос, действительно, ли холестерин является «дирижером процессов внутриклеточной сигнализации», т.е. является активным фактором\ способным регулировать эффективность синаптической передачи, как считает диссертант, или же его наличие в необходимом количестве и в нужном месте является прежде всего непременным условием нормального физико-химического состояния мембран клеток, участвующих в синаптической передаче. Несомненно, существует специфическое непосредственное взаимодействие холестерина с определенными мембранными белками, но представляется столь же несомненным повреждение мембраны и существенное изменение ее физико-химических свойств, вызванные удалением холестерина, в частности, при действии МЦД. Последнее способно изменить функциональные возможности большинства компонентов известных протеом, в том числе и пре- и постсинаптических. Дальнейшие исследования необходимы для того, чтобы взвесить соотношение этих двух возможных механизмов (регулирующего и нормализующего состояние мембраны) в наблюдавшихся феноменах. Если же искать «дирижера в синпатическом оркестре», то первым на эту роль может претендовать кальций. Достаточное содержание холестерина в синаптических мембранах может



расцениваться как пример одного из многочисленных условий для посреднической и регулирующей роли ионов кальция.

2. Следующий мой вопрос более подробно был изложен выше и касался возможных различий механизмов спонтанного освобождения, вызываемого разными способами: деполяризацией терминали и удалением холестерина.

3. В ходе проведенных исследований было впервые установлено, что блокирование эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул, вызванное удалением холестерина, приводит к истощению везикулярных пулов и снижению концентрации везикулярных переносчиков в аксоплазме. Почему тогда усиливается неквантовое освобождение АХ? Казалось бы, должно быть наоборот.

4. Требуется более конкретное объяснения, желательно в виде схемы, механизм закисления аксоплазмы в результате удаления холестерина. К сожалению, на основе приведенных в диссертации результатов трудно оценить интенсивность этого закисления, а значит и его роль. Судя по диапазону калибровочной кривой, наблюдавшиеся изменения флуоресценции соответствовали очень узкому диапазону 7.12 – 7.22 рН (стр. 91). Не вполне понятно, как при применении флуоресцентного метода была обеспечена такая точность измерения рН, так же как не вполне понятна трактовка механизма столь высокой чувствительности неквантового освобождения АХ к изменениям рН в пределах 0.1 единицы.

При детальном знакомстве с текстом диссертации возник также ряд замечаний.

1. Термин «липидный плотик» дублируется рафтом, микрорафтом (?), липидным микродоменом. Также используются «липидное зеркало мембраны» и «липидная сигнальная платформа» (?). Существуют ли различия между содержанием этих терминов.
2. Молекула холестерина плоская, поэтому можно различать две ее поверхности. Какие критерии позволяют диссертанту считать одну из них «гладкой», а другую «шероховатой» и приписывать им разные функциональные свойства? Скорее следовало бы обсуждать набор ее разрешенных конформаций, в самом деле определяющих возможности холестерина взаимодействовать с соседними липидами и белками в мембране.
3. Есть замечание по поводу обзора литературы, касающееся не касается его полноты и компетентности. При чтении невольно обращает на себя внимание избыточное

самоцитирование. Часто необходимые литературные ссылки на первоисточники сопровождаются более поздними по дате ссылками на обзорные статьи, соавтором которых был диссертант. Этого следовало бы избегать.

Поставленные вопросы и высказанные замечания никак не влияют на высокую оценку диссертационной работы Петрова А.М. и не ставят под сомнения результаты исследования и положения, выносимые на защиту.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

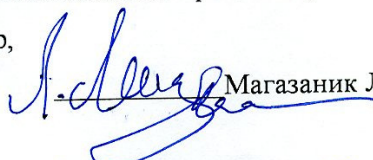
Анализ актуальности, результатов и выводов, новизны и научно-практической значимости, качества опубликованных работ и степени личного участия позволяет сделать заключение, что диссертация Петрова Алексея Михайловича «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, полностью соответствует специальностям 03.01.02. – биофизика и 03.03.01 – физиология, и является законченным авторским научно-квалификационным трудом, содержащим крупное научное достижение, связанное с расширением представлений о роли холестерина в синаптической передаче. По актуальности, новизне и научно-практической значимости, объему и качеству диссертационная работа Петрова Алексея Михайловича «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний», выполненная при консультировании профессора, д.м.н., чл.-корр. РАН А.Л. Зефирова, полностью соответствует требованиям ВАК Министерства образования и науки РФ (п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Петров Алексей Михайлович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02. – «биофизика» и 03.03.01 – «физиология».

Главный научный сотрудник

Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург, лаборатория биофизики синаптических процессов,

Член-корреспондент РАН, профессор,

доктор биологических наук

 Магазаник Лев Гиршевич



Магазаника Л.Г.  
Шифр (Сеченов И.И.)  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук  
26.05.2016

8

С составом знаков Лидов  30.05.2016



Г.н.с., чл-корр. РАН, д.б.н. Л.Г. Магазаник,  
194223 Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44, Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.  
Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), лаборатория биофизики  
синаптических процессов, Телефон: (812) 552-3138, E-mail: levmagazanik100@gmail.com