

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

Актуальность темы исследования

Основным способом межнейронной коммуникации в нервной системе является химическая синаптическая передача, которая опосредуется высвобождением молекул нейромедиатора из синаптических везикул. Синаптические везикулы, формирующие скопления рядом с активными зонами пресинаптической мембраны, в ответ на приход импульса высвобождают медиатор путем слияния мембраны везикулы с пресинаптической мембраной (экзоцитоз). После экзоцитоза истощение запасов везикул и увеличение площади поверхностной мембраны предотвращается эндоцитозом, в процессе которого образуется новая везикула, заполняющаяся нейромедиатором и приобретающая способность к новому раунду высвобождения нейромедиатора. Оборот везикул, наблюдающийся в течение длительной и/или интенсивной нейрональной активности, обеспечивает надежность и определяет эффективность секреции нейромедиатора, а, следовательно, синаптической передачи в целом. Широкий спектр белок-белковых и белок-липидных взаимодействий обеспечивает высокий уровень регуляции и координации цикла синаптических везикул, необходимый для синаптической пластичности.

Существенную роль в функционировании синаптического аппарата играет холестерин, являющийся одним из главных липидных компонентов клеточной мембраны. Его содержание в нейрональных мембранах существенно выше, чем в мембранах соматических клеток, а нарушения метаболизма холестерина сопровождаются неврологическими расстройствами и дисфункцией синаптической передачи. Поэтому выявление значения холестерина в организации цикла синаптических везикул и процессах высвобождения нейромедиатора, безусловно, является актуальным направлением биофизики и физиологии синаптических процессов. Диссертационное исследование А.М.Петрова охватывает большой ряд актуальных вопросов, касающихся влияния снижения уровня мембранного холестерина и его окисления на разные этапы везикулярного цикла (экзо-, эндоцитоз, транспорт везикул) и варианты освобождения нейромедиатора (вызванное, спонтанное, невезикулярное).

Новизна полученных результатов, выводов и положений, выносимых на защиту

Имеющиеся на сегодняшний день сведения о роли холестерина и его окисленных производных в синаптической передаче в основном касаются постсинаптических феноменов, в то время как пресинаптические везикулярные процессы, изучению которых посвящена диссертационная работа, исследованы недостаточно. Поэтому выводы и положения, выносимые на защиту, а также многие

результаты работы носят приоритетный характер. Новыми являются данные о том, что нарушения синаптической передачи при удалении небольшого количества холестерина из плазматических мембран происходят за счет угнетения вызванного экзоцитоза синаптических везикул и их транспортировки в сайты экзоцитоза, а при удалении холестерина дополнительно из мембран синаптических везикул – вследствие блокады эндоцитоза и, соответственно, везикулярного цикла. Такое разделение функций мембранного и везикулярного холестерина, как указывает автор, может быть связано с несмешиваемостью двух пулов холестерина – пресинаптической мембраны и везикул. Косвенно в пользу этого свидетельствуют представленные в диссертационной работе оригинальные данные о наличии чувствительных к содержанию холестерина липидных рафтов в участках поверхностных мембран, где протекают экзо- и эндоцитоз, и концентрировании рафтов внутри мембран рециклирующих синаптических везикул. В работе впервые описан зависимый от активных форм кислорода (АФК) и внутриклеточного кальция механизм, обеспечивающий феномен стойкого усиления спонтанного освобождения нейромедиатора при существенном истощении мембранного холестерина. Одним из интригующих аспектов диссертационной работы является обнаружение зависимости механизма спонтанного освобождения нейромедиатора, сопряженного с удалением холестерина, от активности протеинкиназы *C*, не зависящей от кальция и фосфолипазы *C*. В работе впервые показано значение холестерина в невезикулярном освобождении ацетилхолина из двигательных нервных окончаний. Обнаружено, что удаление небольшой части мембранного холестерина увеличивает невезикулярную секрецию, способствуя активации везикулярного транспортера ацетилхолина в пресинаптической мембране и вызывая закисление аксооплазмы. Таким образом, автор впервые приходит к заключению, что молекулы холестерина выступают связующим звеном между квантовой и неквантовой секрецией медиатора в нервно-мышечных синапсах. Эксперименты с применением бактериального фермента холестерин оксидазы позволили впервые установить, что окисление небольшой фракции холестерина синаптических мембран, помимо рафт-дестабилизирующего эффекта, изменяет везикулярный цикл, воздействуя на механизм освобождения нейромедиатора и снижая эффективность участия везикул резервного пула в нейротрансмиссии вследствие нарушения кластеризации везикул. Данные об изменении везикулярных процессов при ферментативном окислении эндогенного холестерина до 4-холестен-3-она послужили для автора отправной точкой для пионерского исследования эффекта окисленного варианта оксихолестерина, 5 α -холестан-3-она, усиленное образование которого наблюдается при генетическом заболевании – церебротендинальном ксантоматозе. Было показано, что 5 α -холестан-3-он в низкой концентрации (0.2 μ M) влияет на свойства синаптической мембраны (снижая стабильность рафтов) и уменьшает как вероятность вызванного экзоцитоза, так и популяцию синаптических везикул, активно вовлекающихся в нейротрансмиссию при ритмической нейрональной активности. Интересен обнаруженный в работе факт ослабления влияния оксистерола на свойства мембраны и экзоцитоз везикул при

изменении исходного содержания холестерина в мембране, что указывает на холестерин-зависимость эффектов оксистерола. Таким образом, в работе получены убедительные данные о влиянии на пресинаптический везикулярный цикл и вызванное освобождение нейромедиатора оксистеролов, которые могут появляться в биологических мембранах (по крайней мере, в патологических условиях).

Таким образом, содержащиеся в диссертационном исследовании положения, выводы и результаты раскрывают новые механизмы, с помощью которых холестерин участвует в синаптической передаче, в частности, везикулярном экзо-эндоцитозном цикле и разных вариантах секреции нейромедиатора. В целом, проведенные А.М.Петровым исследования вносят существенный вклад в систему фундаментальных знаний о процессах везикулярного высвобождения медиатора и роли холестерина в функционировании синапсов.

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

В диссертационном исследовании использованы классические электрофизиологические методы в сочетании с современными оптическими подходами. Все методы применены в оптимальной конфигурации, что обеспечивает достоверность полученных данных. Все выводы и ключевые результаты основываются на статистически корректно обработанных данных, а многие положения работы подтверждены при параллельном использовании нескольких экспериментальных подходов. Дизайн экспериментов полностью соответствует поставленной цели и обеспечивает решение задач исследования. Результаты работы полно опубликованы в рецензируемых авторитетных журналах, следовательно, прошли этапы независимой экспертизы.

Для удаления холестерина применялся метил- β -циклодекстрин (М β ЦД) - специфичный агент, наиболее широко используемый для этих целей. В выводе №1 говорится о высоком содержании холестерина в нервно-мышечном синапсе и его участии в формировании скоплений ганглиозидов GM1 (рафтов), а также об аккумуляции рафтов в областях пресинаптической мембраны, предназначенных для экзо-эндоцитоза, и в мембранах синаптических везикул. Вывод сделан на основе идентификации мембранного холестерина с помощью флуоресцентного антибиотика филипина, связывающегося в соотношении 1:1 с холестерином, и окрашивания мембран меченой субъединицей *B* холерного токсина, селективно взаимодействующей со скоплениями ганглиозидов GM1, которые обнаруживаются в пределах липидных рафтов. Для идентификации рафтов в мембранах синаптических везикул двигательные нервные окончания стимулировали в присутствии *B* субъединицы холерного токсина. Все примененные подходы позволяют судить о степени насыщения синаптических мембран холестерином и наличии рафтов в мембранах везикул, а также о взаиморасположении рафтов и популяции синаптических везикул. Следует подчеркнуть, что в экспериментах, проведенных на нервно-мышечных препаратах лягушки и мыши, были получены сходные результаты.

Положение №1 и соответствующие выводы (№2 и №3) о важности холестерина поверхностных мембран для протекания вызванного экзоцитоза, а везикулярного холестерина для эндоцитозного рециклирования везикул основываются на приеме, впервые примененном автором и позволяющем преимущественно воздействовать или на холестерин плазматических мембран, или одновременно на холестерин плазматических мембран и рециклирующих синаптических везикул. В первом случае холестерин-удаляющий агент действует на покоящуюся нервную терминаль, а во втором – во время инкубации с низкой дозой МВЦД производится высокочастотная стимуляция, вызывающая встраивание мембран везикул в пресинаптическую мембрану, в результате чего холестерин удаляется и из мембран экзоцитировавших везикул. Этот прием представляется уместным и эффективным для разделения функций холестерина пресинаптической и везикулярной мембран. Оценка пресинаптических процессов была проведена с помощью FM-красителей, которыми загружались синаптические везикулы, и детекции токов концевой пластинки, отражающих квантовые события освобождения нейромедиатора в ходе экзоцитоза. Корректное сравнение данных, полученных оптическими и электрофизиологическими методами, позволило оценить среднее время рециклирования синаптических везикул. Хотя положение №1 основывается изначально на экспериментах, проведенных на нервно-мышечных синапсах лягушки, специфика роли холестерина пресинаптической и везикулярной мембраны была подтверждена автором в экспериментах на препарате диафрагмальной мышцы крысы, что указывает на универсальность сделанных выводов. Важно отметить, что эффект наблюдался при удалении небольшой части мембранного холестерина, что подчеркивает значение даже малых изменений уровня холестерина мембран в пресинаптических процессах. Позднее справедливость вывода автора о специфичной роли холестерина синаптических везикул была подтверждена в независимых экспериментах на центральных синапсах [Yue HY, Xu J, J Neurochem. 2015;134(2):247-60].

Положение №2 (выводы №4 и №5) описывает впервые выявленный в работе механизм ограничения спонтанного экзоцитоза синаптических везикул присутствующим в мембране холестерином. Показана связь этого процесса с продукцией АФК, а также зависимость механизма (полный или kiss-and-run) спонтанного экзоцитоза, сопряженного с удалением значительной доли мембранного холестерина, от активности протеинкиназы C, не связанной с кальцием и фосфолипазой C. Данное положение полностью подкрепляется результатами экспериментов, где с помощью трех независимых флуоресцентных меток было обнаружено увеличение продукции АФК вслед за удалением значительного количества холестерина и зависимое от увеличения АФК возрастание цитозольного уровня кальция. Предположение о том, что всплеск цитозольного кальция регулирует спонтанный экзоцитоз через фосфатазу кальциневрин, было проверено фармакологическим путем с помощью селективной блокады фосфатазы циклоспорином А. Утверждение об изменении механизма экзоцитоза с полного»

варианта на kiss-and-run основывается на парадоксе между данными оптического и электрофизиологического методов. В условиях ингибирования протеинкиназы C, но не хелатирования внутриклеточного кальция или блокады фосфолипазы C, флуоресцентный краситель FM1-43 оказывался «запертым» в нервном окончании, несмотря на значительное увеличение при удалении холестерина частоты спонтанных постсинаптических сигналов, указывающее на интенсивное освобождение нейромедиатора. Соглашусь, что единственное рациональное объяснение такого феномена – освобождение медиатора через скоротечную белковую пору слияния (kiss-and-run), проницаемую для медиатора, но не для амфифильных молекул красителя. Фигурирующие в положении №2 утверждения получены при использовании высокой дозы МВЦД, удаляющей значительную часть мембранного холестерина. Поэтому обнаруженные феномены могут лежать в основе дисбаланса синаптической передачи, наблюдаемого при прогрессирующей потере мембранного холестерина.

Положение №3 (вывод №6) говорит об ограничении невезикулярного освобождения ацетилхолина присутствующим в мембране холестерином с помощью механизма, зависящего от везикулярного транспортера ацетилхолина и баланса процессов экзоцитоза/эндоцитоза. Данное утверждение основывается на детекции некантового выброса ацетилхолина классическим электрофизиологическим методом регистрации Н-эффекта, который позволяет косвенно судить о количестве ацетилхолина, накапливающегося в синаптической щели и деполяризующего постсинаптическую мембрану. Был применен также оптический метод для слежения за внеклеточным уровнем ацетилхолина при сохранении активности ацетилхолинэстеразы. Было показано, что удаление небольшого количества холестерина, не влияя на спонтанное освобождение, увеличивало Н-эффект и концентрацию ацетилхолина в наружной среде, что сопровождалось снижением цитозольного рН. Эти эффекты блокировались селективным ингибитором везикулярного транспортера ацетилхолина везамиколом и закислением цитоплазмы с помощью пропионата натрия. Полученные результаты приводят автора к логичному заключению о том, что удаление небольшой части холестерина стимулирует некантовую секрецию ацетилхолина за счет усиления активности его везикулярного транспортера в поверхностной мембране, обменивающего ацетилхолин на протоны. Эти данные свидетельствуют высокой чувствительности невезикулярной секреции ацетилхолина к изменению уровня холестерина в мембране.

Положение №4, отраженное в выводах №7 и №8, указывает на зависимость освобождения нейромедиатора, пресинаптических везикулярных процессов и состояния синаптических мембран от окисления мембранного холестерина и действия окисленного производного холестерина, 5 α -холестан-3-она. Мембранный холестерин окислялся бактериальным ферментом холестерин оксидазой, с контролем эффективности реакции оптическим методом. На изменение свойств мембран в этих условиях указывает снижение окрашивания субъединицей В холерного токсина, маркирующей рафты. Эксперименты с флуоресцентными FM-красителями и

регистрацией токов концевой пластинки обеспечили убедительные аргументы в пользу того, что в этих условиях везикулы рециклирующего пула изменяют механизма экзоцитоза на kiss-and-run путь, тогда как везикулы резервного пула в существенно меньшей степени вовлекаются в экзоцитоз при высокочастотной активности. Как справедливо отмечает автор, одной из причин ослабления участия резервного пула может быть нарушение кластеризации везикул, на что указывает «расплывание» флуоресцентных FM-пятен при сохранении яркости флуоресценции в контуре нервной терминали. В целом, окисление холестерина ослабляло экзоцитоз как в ответ на одиночные потенциалы действия, так и длительную высокочастотную стимуляцию, указывая на высокую чувствительность синаптической передачи к состоянию мембранного холестерина (окисленное или нет). Обнаружение эффектов холестерин оксидазы поставило вопрос о возможном влиянии образующихся эндогенно окисленных производных холестерина на пресинаптические процессы. Был выбран 5 α -холестан-3-он, поскольку он близок по структуре к продукту реакции, катализируемой холестерин оксидазой и эндогенно образуется в тканях, где его уровень может значительно возрастать при наследственном заболевании – церебротендинальном ксантоматозе, поражающем, в том числе, нервно-мышечную систему. В концентрации 0.2 μ M 5 α -холестан-3-он, не изменяя распределения синаптических белков – синтаксина 1 и синаптобревина (показано иммунофлуоресцентным методом), снижал окрашивание субъединицей *B* холерного токсина и усиливал флуоресценцию 22-NBD-холестерина в синаптической области. Это указывает на разрушение липидных рафтов без сильных изменений организации пресинаптического аппарата. Использование FM-красителей и детекция токов концевой пластинки указали на снижение вероятности экзоцитоза в ответ на одиночные раздражения и высокочастотную стимуляцию двигательного нерва. В последнем случае эффект 5 α -холестан-3-она обеспечивался как за счет снижения количества синаптических везикул, активно рециклирующихся в течение синаптической активности, так и в результате уменьшения общей популяции везикул, вовлекающихся в нейротрансдукцию. Данный вывод был подтвержден с помощью оригинального подхода – использования последовательного окрашивания одного препарата двумя FM красителями (красным и зеленым) и визуализации одной и той же нервной терминали, в которой была помечена доля активно функционирующих везикул до и после воздействия оксистерола. Влияние оксистерола на экзоцитоз везикул и липидные рафты оказалось зависимым от исходного содержания холестерина, поскольку манипуляции с мембранным холестерином (удаление или насыщение), произведенные до аппликации оксистерола, резко ослабляли эффекты последнего. Следует отметить, что как окисление мембранного холестерина, так и 5 α -холестан-3-он не влияли на частоту миниатюрных токов концевой пластинки, что указывает на высокую чувствительность к оксистеролам вызванного, а не спонтанного, освобождения нейромедиатора.

В целом, анализ результатов приводит к заключению о том, что все выводы и положения, выносимые защиту, полностью достоверны и обоснованы. Цель и все

поставленные в диссертационном исследовании задачи полностью выполнены, что отражено в выводах работы.

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

Диссертационное исследование посвящено решению фундаментальной проблемы биофизики и физиологии синаптической передачи и имеет большое значение для развития представлений о роли мембранного холестерина и его производных в нейротрансмиссии. Учитывая, что на ранних стадиях многих нейродегенеративных заболеваний, а также при старении организма наблюдаются нарушения гомеостаза холестерина, ведущие к снижению его содержания в синаптических мембранах и повышению образования ряда оксистеролов, ключевые положения работы будут востребованы в исследованиях механизмов изменений синаптической передачи при дисфункциях нервной системы. Кроме того, небольшое снижение холестерина в синаптических мембранах может быть вызвано длительной нейрональной активностью, что, исходя из концепции диссертационной работы, должно вести к изменению наиболее холестерин-чувствительных этапов везикулярного цикла, а также вызванной и невезикулярной секреции нейромедиатора. Следовательно, описанные в автором изменения при частичном удалении мембранного холестерина могут иметь место в ходе эндогенной нейрональной активности. Выводы работы следует учитывать при фармакологических и клинических исследованиях препаратов, влияющих на метаболизм холестерина (например, статинов). Результаты работы касаются процессов, которые сходным образом протекают во многих типах клеток, поэтому могут быть использованы в исследованиях мембранного везикулярного транспорта, не связанного с синаптическим аппаратом. Обнаруженные в работе эффекты окисления холестерина дают повод обратить внимание на изучение оксистерол-зависимых механизмов регуляции синаптической коммуникации, в частности, представляет интерес выяснить, как эндогенное образование оксистеролов может модулировать нейротрансмиссию, и каково физиологическое/патологическое значение оксистеролов в синаптической трансмиссии. Обнаруженная в исследовании связь холестерина, участвующего в везикулярном цикле, с активностью сигнальных молекул развивает концепцию о значении холестерина как ключевого диспетчера внутриклеточных сигнальных систем.

В целом, результаты, выводы и положения работы позволяют рассматривать мембранный холестерин в новом свете - как элемент, связывающий вызванный и спонтанный экзоцитоз нейромедиатора, его невезикулярное освобождение, механизм экзоцитоза («полный» или через пору слияния), вовлечение везикулярных пулов в нейротрансмиссию, эндоцитоз, внутриклеточную сигнализацию и состояние синаптической мембраны.

Методический уровень исследования

Диссертационная работа выполнена с применением современного оборудования для электрофизиологических и светомикроскопических исследований.

Были использованы классические электрофизиологические микроэлектродные методы, которые позволяют оценивать освобождение нейромедиатора из нервных окончаний в ходе спонтанного и вызванного экзоцитоза синаптических везикул. Использованный электрофизиологический метод оценки некантовой секреции нейромедиатора по величине Н-эффекта позволил получить репрезентативные данные об этом виде секреции в условиях, обеспечивающих неизменность функционирования постсинаптических холинорецепторов. Оптические методы были в основном связаны с применением флуоресцентной конфокальной микроскопии. Использованы современные флуоресцентные маркеры, позволяющие оценивать (1) процессы экзо- и эндоцитоза (FM1-43, FM2-10, FM4-64 и их тушители ADVASEP-7, сульфородамин 101), (2) - внутриклеточный кальций (Fluo4-AM), (3) продукцию АФК (H2DCFDA, Amplex Red H₂O₂ kit), (4) перекисное окисление липидов (iT-lipid peroxidation sensor), (5) внеклеточный уровень ацетилхолина (Amplex Red acetylcholine assay kit), (6) цитоплазматический pH (BCEFCF-AM), (7) свойства синаптических мембран (субъединица *B* холерного токсина, 22-NBD-холестерин, филиппин). Было использовано также иммунофлуоресцентное мечение белков (синтаксин, синаптобrevин, TRPV1-каналы). Диапазоны длин волн возбуждения и светофильтры для регистрации флуоресценции подобраны оптимальным образом. В случаях, когда препараты окрашивались одновременно двумя красителям, параметры для возбуждения и регистрации эмиссии были выбраны таким образом, чтобы предотвратить возможность «засветки» от одного из красителей при регистрации флуоресцентного сигнала от другого. Все необходимые контрольные эксперименты были выполнены. Схемы и протоколы экспериментов выстроены оптимально, исходя из задач исследования.

Таким образом, методический уровень работы полностью соответствует современному мировому уровню для исследований в области синаптической передачи и везикулярного экзо-эндоцитозного транспорта.

Анализ структуры работы

Диссертация изложена на 277 страницах и включает традиционные разделы. Во введении (на 8 стр.) автор обосновывает актуальность работы, формулирует ее цель, которая четко раскрывается в задачах. Новизна и значимость работы представлены обосновано, без спекуляций. В положениях, выносимых на защиту, четко сформулирована суть работы, и все 4 положения согласованы и объединены целью исследования. Отражено личное участие автора и перечислены все соавторы статей, которые оказали помощь в выполнении ряда экспериментов. Есть параграфы о достоверности полученных данных, апробации работы, публикациях по теме исследования и структуре диссертации. Обзор литературы (63 стр.) читается легко, что связано как с логичным изложением материала, так и хорошо подобранными иллюстрациями (27 рисунков). Обзор поделен на разделы, дающие представления об устройстве синаптического аппарата, процессах экзо- и эндоцитоза синаптических везикул, их рециклировании, организации в пулы, а также о роли холестерина и липидных рафтов в функционировании нейронов и, в частности, в синаптической

передаче. Обзор позволяет оценить современное состояние проблемы и место результатов диссертационного исследования в существующих представлениях о нейротрансмиссии. Методы исследования изложены компактно на 16 страницах. Дано описание растворов и фармакологических агентов, оборудования для электрофизиологических и оптических экспериментов, а также протоколов экспериментов и статистического анализа. Изложенная в разделе информация позволяет специалисту воспроизвести выполненные автором эксперименты. Самый большой по объему раздел работы (128 страниц) посвящен результатам и их обсуждению. Данный раздел хорошо структурирован, написан лаконично и четко. Согласно поставленным задачам, глава «Результаты и их обсуждение» разделяется на подглавы, соответствующие решаемым задачам. Большое количество многокомпонентных рисунков (их 44), представляющих данные экспериментов и нативные сигналы/изображения, позволили автору компактно изложить результаты, несмотря на большой объем выполненных экспериментов и полученных данных. Обсуждение результатов экспериментов дано компактно (составляет около 1/5 от объема главы «Результаты и их обсуждение») и объективно, без рассуждений, непосредственно не связанных с результатами работы. В разделе «Заключение» автор подводит итог работы, объединяя все полученные данные в единую новую концепцию о роли холестерина в синаптической передаче. Включают текст диссертации «Выводы» и Список сокращений и литературы. Выводы, сделанные на основании полученных автором данных, обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Список литературы включает 483 источника (31 отечественный и 452 зарубежных) и полностью соответствует ссылкам в тексте.

В целом, диссертационная работа Петрова А.М. характеризуется внутренним единством, хорошо структурирована и иллюстрирована, написана хорошим литературным языком. Автореферат диссертации Петрова А.М. позволяет получить достаточные представления о содержании диссертации и полностью соответствует идеям и выводам диссертации.

Качество опубликованных работ по теме диссертационного исследования, степень участия автора

По теме диссертационного исследования автором было опубликовано 18 статей в ведущих профильных отечественных (Биофизика, Журнал эволюционной физиологии и биохимии, Российский физиологический журнал, Нейрохимия, Доклады академии наук, Успехи физиологических наук, Acta Naturae, Бюллетень экспериментальной биологии и медицины) и зарубежных (Journal of Neuroscience, Neuroscience, Journal of Physiology, Biochimica et Biophysica Acta, Biochemical and Biophysical Research Communications) рецензируемых журналах, входящих в перечень утверждённый ВАК, и международные базы цитирования. В большинстве этих публикаций Петров А.М. фигурирует как первый или последний корреспондирующий автор, осуществляющий руководство исследованием и написание статей, поэтому не вызывает сомнений основной вклад автора в перечисленные работы. В данных публикациях полностью изложены основные результаты и все выводы,

представленные в диссертационной работе. В работах автора, опубликованных в материалах конференций и иных научных изданиях (39 публикаций), фигурирует изданная в 2010 г монография (324 с + 32 с цветные вкладки), непосредственно связанная с тематикой диссертационной работы, и глава в коллективной монографии (2014 г.). Следует отметить, что тезисы опубликованы в сборниках авторитетных всероссийских и международных профильных научных конференций.

Считаю качество опубликованных автором работ высоким и соответствующим требованиям ВАК. Также дополнительно отмечу, что результаты работы полностью опубликованы в рецензируемых изданиях из списка ВАК, и знакомы специалистам в области биофизики и физиологии синаптической передачи.

Замечания и вопросы к содержанию диссертационной работы

Принципиальных критических замечаний к диссертационному исследованию Петрова А.М. у меня нет. Есть некоторые замечания, касающиеся оформления работы. Хотя диссертация в целом написана хорошим языком, автор не избежал лабораторных жаргонизмов, таких как "флуоресцентные эксперименты", "экзоцитозный краситель" и др. Есть ошибочные ссылки на рисунки (стр. 99, 102, 115). Заболевание, связанное с выработкой антител к ганглиозидам GM1, автор называет синдромом Джулиана-Барре. Однако в отечественной клинической практике это заболевание принято называть синдромом Гийена-Барре.

Кроме того, хотелось бы получить ответы на несколько вопросов, возникающих при чтении работы:


1. Использование МВЦД для удаления холестерина из клеточных мембран - широко распространенный экспериментальный прием. Однако в большинстве исследований эта процедура проводится при температуре 37°C. В диссертационной работе исследования на нервно-мышечных синапсах лягушки проводились при температуре 20-21°C, а на препарате диафрагмальной мышцы мыши и крысы при температуре 23-24°C. При этом концентрации и длительность воздействия МВЦД были сходными. Наблюдались ли различия в степени и характере воздействия МВЦД в этих препаратах?
2. Не достаточно ясен механизм, посредством которого холестерин удаляется из мембран синаптических везикул при действии МВЦД. Происходит ли это в тот момент, когда мембранные фрагменты синаптических везикул встраиваются в пресинаптическую мембрану и контактируют с раствором, содержащим МВЦД (т.е. этот процесс происходит очень быстро), или МВЦД способен захватываться везикулами во время эндоцитоза? Есть ли вероятность того, что наблюдаемый эффект является результатом "разборки" рафтов под действием МВЦД, приводящей к изменениям липид-белковых взаимодействий и мобильности мембранных белков?
3. На сегодняшний день нет устоявшихся представлений о размерах и времени жизни липидных рафтов в нативных биологических мембранах. Возможно ли на основании представленных данных судить об этих характеристиках рафтов, участвующих в эндо/экзоцитозе?

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, тема диссертационного исследования Петрова Алексея Михайловича «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний» полностью соответствует заявленным специальностям 03.01.02. – биофизика и 03.03.01 – физиология. Сама диссертационная работа Петрова Алексея Михайловича, представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук и выполненная при научном консультировании член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора А.Л. Зефирова, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения о роли холестерина в процессах синаптической коммуникации, совокупность которых можно квалифицировать как новое научное достижение в области биофизики и физиологии.

Анализ актуальности, методического уровня, объема полученных экспериментальных данных, результатов и выводов, новизны, научно-практической значимости представленной работы позволяет заключить, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Петров Алексей Михайлович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02. – «биофизика» и 03.03.01 – «физиология».

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, Отдел исследований мозга ФГБНУ НЦН,
Тел. раб. (495) 917 96 64; e-mail: sharonova.irina@gmail.com

Даю согласие на сбор, обработку и хранение
персональных данных

 И.Н.Шаронова

Подпись, ученую степень Шароновой Ирины Николаевны заверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ НЦН, к.м.н.

« 11 » мая 2016 г.





А.Н.Евдокименко

С согласия заявителя
16.05.16 