

О Т З Ы В

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

Актуальность диссертационного исследования. Изучение механизмов химической синаптической передачи является одним из актуальных направлений в нейробиологии. В настоящее время ведутся интенсивные исследования самых разнообразных типов химических синапсов в целях изучения участия везикулярного цикла в процессах синаптической передачи и синаптической пластичности. Механизмы секреции нейромедиаторов детально и всесторонне исследованы в различных синаптических контактах центральной и периферической нервной системе. Вместе с тем, ряд механизмов синаптической передачи, такие как механизмы эндоцитоза везикул, их повторное использование для секреции медиатора, спонтанная и невезикулярная секреция медиатора остаются малоизученными. Особую роль в функциях синаптического аппарата играет мембранный холестерин. Значение холестерина для синаптической передачи определяется его прямым взаимодействием с некоторыми рецепторами, ионными каналами и ферментами. Холестерин является компонентом так называемых липидных плотиков (рафтов), которые участвуют в организации сигнальных путей, мембранном и ионном транспорте, а их нарушение приводит к различным клеточным дисфункциям. Следует, однако, отметить, что многие аспекты участия холестерина в механизмах синаптической передачи практически не исследованы.

По существу новый этап в изучении указанных механизмов стал возможен благодаря применению современных, качественно новых подходов и методик, позволяющих в динамике изучать функции синапсов на молекулярном уровне. Используя новые методические подходы для решения поставленных проблем Петров А.М. в диссертационной работе исследовал роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора. Важно отметить, что в работе изучены не только функции холестерина, но и его метаболитов. Окисленные формы холестерина, оксистеролы, обладают высокой биологической активностью, вовлекаются как в нормальные, так и патологические реакции клеток, взаимодействуя с различными белками, молекулами внутриклеточной сигнализации, участвуют в регуляции различных клеточных процессов, вплоть до ядерных.

Актуальность рассматриваемых в работе вопросов определяется так же тем, что проблемы, изучению которых посвящена диссертационная работа, имеют важный социальный и медицинский аспекты, особенно в связи с распространением ряда неврологических заболеваний, важнейшими проявлениями которых являются нарушение процессов синаптической передачи. Показано, в частности, что содержание холестерина в

синаптических мембранах и продукция оксистеролов может быть важным звеном патогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний, а также процессов развития и старения.

Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, посвященных различным разделам исследований, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

В разделе «Обзор литературы» проведен глубокий и всесторонний анализ проблем, связанных с темой диссертации. Основное внимание автор уделил детальному описанию морфологических и функциональных характеристик нервно-мышечных синапсов, молекулярных механизмов, вовлекаемых в синаптическую передачу. Описаны особенности формирования синаптических везикул, везикулярный цикл, молекулярные ансамбли, участвующие в заправке везикул ацетилхолином, ионном обмене, транспорте везикул и др. Представлены данные о механизмах экзоцитоза, включающим сцепление, докирование, прайминг и слияние везикул. Обзор литературы свидетельствует о достаточно полной информированности автора в вопросах, связанных с темой диссертации. Читается этот раздел легко и с большим интересом. Это не сумма или нагромождение фактов, а логичное, последовательное описание синаптических структур и функции, создающих почти «объемное» представление о процессах, протекающих в синапсах. Особенно удачно описаны процессы, лежащие в основе экзо- и эндоцитоза синаптических везикул. Несомненным достоинством обзора литературы являются многочисленные, хорошо проработанные иллюстрации, которые удачно дополняют и поясняют текстовое изложение материала.

Можно отметить и некоторые недостатки этого раздела. Так, описание постсинаптических процессов значительно уступает по объему и детализации другим разделам обзора литературы. Описанные механизмы глутаматергической передачи, не имеют прямого отношения к целям и задачам диссертационной работы и, возможно, могли бы быть сокращены или удалены. Кроме того, было бы полезным в заключение обзора кратко сформулировать нерешенные вопросы обсуждаемой проблемы, и, в связи с ними, более конкретно обосновать постановку задач исследования. Сделать это было бы достаточно просто, учитывая, что многие нерешенные вопросы обсуждаются по ходу изложения результатов исследований. В целом, необходимо отметить, что обзор литературы может служить прекрасным пособием для специалистов и студентов различных вузов, интересующихся проблемами синаптической передачи.

Исследование хорошо продумано и спланировано. Работу отличает комплексный методический подход к проведенным исследованиям с впечатляющим разнообразием и сложностью примененных методов, позволивших провести анализ функциональной и морфологической организации синапсов на разных уровнях – от органного до молекулярного. Эксперименты выполнены на нервно-мышечных препаратах различных видов животных: лягушек, мышей и крыс. В электрофизиологических опытах методами фиксации потенциала мембраны регистрировали токи концевой пластинки и миниатюрные потенциалы. Везикулярные процессы оценивали оптическими методами с использованием различных специфических красителей, позволяющих изучать молекулярные процессы,

лежащие в основе синаптической передачи. Использовали флуоресцентные и иммунофлуоресцентные методы. Применена адекватная статистическая обработка данных. Исследование проведено с соблюдением правил по использованию лабораторных животных. Использованные методические приемы и объект исследования адекватны для решения цели и задач работы. Указан личный вклад автора в экспериментальную работу, а также сотрудников, оказавших помощь в реализации ряда экспериментов. Разнообразие методических приемов позволило автору всесторонне рассмотреть поставленную проблему и явилось одной из важнейших предпосылок достоверности и убедительности выводов и положений диссертации. Адекватен и обоснован поставленной цели и задачам выбор видов животных, на которых проведены исследования.

Раздел «результаты исследований» – добротное, детальное, обширное изложение экспериментальных данных. Главы «Результатов исследований» написаны четким, без особых погрешностей языком. Представленные результаты в целом вызывают интерес и искреннее уважение к огромному объему работы, проделанной автором. Каждая глава содержит литературную справку, отражающую современное состояние проблемы, анализируемой в данной части диссертации, а также особенности методических приемов, использованных в данной серии опытов, результаты исследования и их обсуждение.

Автор обнаружил, что холестерин неравномерно распределяется в нервно-мышечных синапсах и участвует в формировании липидных плотиков (рафтов), которые локализуются в нейрональных мембранах и мембранах синаптических везикул. Петров А.М. исходил из гипотезы, согласно которой липидные плотики и холестерин участвуют в молекулярной организации экзо- и эндоцитоза; плотики везикулярных мембран могут способствовать сохранению специфической белково-липидной композиции мембран везикул на протяжении везикулярных циклов. В соответствии с этой гипотезой, было обнаружено, что частичное уменьшение содержания мембранного холестерина в поверхностных мембранах приводило к снижению стабильности липидных рафтов в синаптическом регионе и к уменьшению секреции нейромедиатора при синаптической стимуляции, а также угнетению процессов пополнения сайтов экзоцитоза новыми везикулами. Вместе с тем в этих условиях не выявлено нарушений эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул. Обсуждая эти результаты, диссертант полагает, что подавление нейротрансмиссии может быть следствием снижения популяции синаптических везикул, вовлекающихся в освобождение медиатора. С другой стороны, если холестерин частично удалялся как из плазматической мембраны, так и из мембран рециклирующих везикул, то в дополнение к вышеописанным эффектам происходило блокирование эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул. Таким образом, автором впервые показано четкое разделение эффектов удаления холестерина из пресинаптических и везикулярных мембран - холестерин плазматических мембран необходим для экзоцитоза и увеличения популяции везикул, вовлекающихся в освобождение медиатора, тогда как везикулярный холестерин важен для эндоцитоза и рециклирования везикул.

Известно, что при выраженном уменьшении содержания мембранного холестерина возрастает нарушение вызванного экзоцитоза и значительно усиливается спонтанное освобождение нейромедиатора. Изучая механизм этого явления, диссертант обнаружил, что истощение мембранного холестерина стимулирует активацию ферментов, вызывающих перекисное окисление липидов синаптических мембран и активирующих вход Ca^{2+} , который, в свою очередь, стимулирует кальциневрин и облегчает спонтанный экзоцитоз.

Впервые было показано, что спонтанный холестерин-зависимый экзоцитоз регулируется протеинкиназой C – ингибирование этой киназы приводило к облегчению секреции нейромедиатора через скоротечную пору слияния. Автор предположил, что в ходе экзоцитоза активация протеинкиназы C необходима для полного встраивания везикулярной мембраны в пресинаптическую мембрану и эти процессы непосредственно не связаны с фосфолипазой C и кальцием. Таким образом, изменение содержания холестерина модулирует активность сигнальных молекулярных каскадов и может оказывать влияние на различные функции синаптического аппарата.

В последующих исследованиях А.М. Петров изучил механизмы другого вида секреции нейромедиатора – его невезикулярное (неквантовое) освобождение. Впервые обнаружено, что частичное удаление холестерина поверхностных мембран увеличивает невезикулярное освобождение, сопровождаемое закислением аксоплазмы. Причем эффект существенно потенцируется в условиях, когда, на фоне стимуляции экзоцитоза, процесс эндоцитоза блокирован за счет частичного удаления везикулярного холестерина. Это холестерин-зависимое невезикулярное освобождение медиатора опосредуется активацией рН-зависимого везикулярного транспортера, Автор полагает, что холестерин синаптических мембран может служить связующим звеном между везикулярными и невезикулярными (неквантовыми) процессами секреции.

А.М. Петровым исследована роль в механизмах функционирования синаптического аппарата не только холестерина, но и продуктов его окислительной модификации – оксистеролов. Впервые обнаружено, что окисление холестерина оксидазой небольшой части мембранного холестерина способствовало освобождению нейромедиатора везикулами рециклирующего пула через короткоживущую пору слияния. В тоже время, в этих условиях экзоцитоз везикул резервного пула протекает с полным встраиванием в пресинаптическую мембрану, но существенно ослаблен.

Данные о влиянии оксистеролов на синаптическую передачу крайне малочисленны. Диссертант впервые выявил высокую биологическую активность оксистерола, 5 α -холестан-3-она, который, не изменяя спонтанного освобождения, угнетал вызванную стимуляцией секрецию медиатора, а также нарушал кратковременную синаптическую пластичность. Дальнейшие исследования показали, что выявленный эффект был связан с уменьшением пула синаптических везикул, вовлекавшихся в секрецию медиатора при стимуляции. Кроме того было выявлено, что оксистерол может снижать стабильность рафтов и, тем самым, изменять свойства синаптических мембран. Интересно отметить, что увеличение или

уменьшение содержания мембранного холестерина, по отношению к его нативному уровню, существенно ослабляли эффекты 5 α -холестан-3-она. Открытие этого феномена позволило Петрову А.М. постулировать существование 5 α -холестан-3-он-связывающего «рецептора», функции которого тесно связаны с содержанием мембранного холестерина.

Завершается работа общим обсуждением результатов (заключением), выводами и списком литературы. Анализируя в целом полученные результаты, А.М. Петров приходит к заключению, что холестерин, присутствующий в мембранах нервно-мышечного синапса, вовлечен в организацию липидных плотиков, а также всех этапов везикулярного цикла, обеспечивающих вызванное освобождение нейромедиатора. Кроме того, он участвует в регуляции невезикулярного и спонтанного освобождения нейромедиатора, а также активности ряда сигнальных путей, вовлеченных в процессы экзоцитоза. Метаболиты холестерина и, в частности, его окисленная форма, не затрагивая спонтанное освобождение, вовлечены в процессы вызванного экзоцитоза и регуляцию пулов синаптических везикул, а также стабильность синаптических рафтов. Петров А.М. заключает, что мембранный холестерин и оксистеролы являются важнейшими регуляторами функций синаптического аппарата – от их содержания в значительной степени зависит эффективность синаптической передачи и синаптическая пластичность.

Полученные в диссертационной работе результаты могут иметь важное практическое значение для изучения патофизиологии некоторых заболеваний, а также применения некоторых фармакологических препаратов. Известно, например, что нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера может приводить к увеличению содержания холестерина в мозге, что может быть одним из механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. Показано, что содержание оксистеролов существенно повышается при некоторых патологиях, в частности болезни Альцгеймера. Кроме того, результаты исследования приобретают особый интерес для понимания последствий применения для фармакологической коррекции обмена холестерина, ингибирующих его синтез агентов (статинов). Так, известно, что хроническое применение статинов может приводить к миастении, которая частично связана с нарушением функций рецепторов ацетилхолина.

Принципиальных замечаний рецензируемое исследование не вызывает. Однако, как и практически любая сложная, значительная по объему работа, диссертация не свободна от недостатков. Помимо приведенных выше замечаний хотелось бы остановиться на следующей проблеме, затронутой в работе. В цели работы указывается, что исследования проведены «... на нервно-мышечных синапсах холоднокровных (лягушка) и теплокровных (мышь, крыса) животных», что невольно подразумевает эволюционный аспект исследования. Однако, в задачах этот аспект не нашел продолжения. В дальнейшем, в тексте диссертации неоднократно упоминается о сходстве и некоторых особенностях механизмов синаптической передачи у исследованных видов животных. Вместе с тем, четкого обсуждения этой

проблемы и ее возможных эволюционных аспектов в работе не приведено. Остается не достаточно понятным, существуют ли принципиальные особенности исследованных механизмов синаптической передачи у разных видов животных, или, напротив, полученные данные свидетельствуют о сходстве этих механизмов?

Указанные замечания имеют дискуссионный и рекомендательный характер и не влияют на общую высокую оценку работы А.М. Петрова.

Характеризуя в целом диссертационное исследование, следует отметить, что работа отличается четким построением экспериментов, тщательностью в обработке и изложении полученного материала, убедительностью, достоверностью и корректностью обсуждения данных. Экспериментальная работа выполнена на высоком методическом и техническом уровне. Несомненны актуальность и новизна работы, документированных данными, которые подробно и корректно обсуждены. Материал, представленный в диссертационной работе, получен на большом количестве экспериментальных животных, обработан и проанализирован лично автором. Выводы, сделанные автором, обоснованы, вытекают из основных разделов диссертации и соответствуют поставленным задачам. Основные положения, выносимые на защиту, сформулированы логично и вытекают из полученных результатов. Наиболее значимые результаты диссертации опубликованы в ведущих мировых и российских журналах, доложены и обсуждены на всероссийских и международных съездах, конференциях и симпозиумах. В автореферате отражено основное содержание диссертации. Работа достаточно полно иллюстрирована. Несомненны актуальность и новизна работы. В списке литературы процитировано 483 источника, большая часть которых датируется последними годами.

Полученные автором экспериментальные результаты и сформулированные теоретические положения могут быть рекомендованы к использованию при чтении курсов лекций по физиологии и биофизике синаптической передачи в высших учебных заведениях биологического и медицинского профиля. Материалы диссертации представляют интерес для исследовательской работы, проводимой на кафедре физиологии человека и животных и на кафедре ВНД МГУ им. М.В. Ломоносова, в Российском национальном исследовательском медицинском университете им. Н.И. Пирогова, в ФГБНУ НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАН, в ФГБУН Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН, ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ФГБУН Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, ФГБУН Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

Изложенное позволяет сделать заключение, что диссертация Петрова Алексея Михайловича «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний», является законченным научно-квалификационным трудом, в котором на основании результатов выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно классифицировать как новое крупное научное достижение, связанное с пониманием

фундаментальной физиологической и биофизической роли липидов и, в частности, холестерина в механизмах синаптической передачи. По актуальности, объему проделанной экспериментальной работы, ее качеству, методическому уровню, новизне и научно-практической значимости полученных результатов диссертация, выполненная при консультировании член-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 от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Петров Алексей Михайлович заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика и 03.03.01 – физиология.

Главный научный сотрудник лаборатории
функциональной нейрохимии
ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии
им. П.К. Анохина»,
доктор медицинских наук,
Никитин Владимир Павлович

Подпись В.П. Никитина заверяю
Начальник отдела кадров



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

О.Б. Ерашов

13 мая 2016 г.

Г.н.с., д.м.н. В.П. Никитин

ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина», 125315 г. Москва, ул. Балтийская, д. 8, а/я 72. 8-(495) 601-22-45. E-mail: nikitin.vp@mail.ru

*С изданием знакомлю
16.05.16 [Signature]*