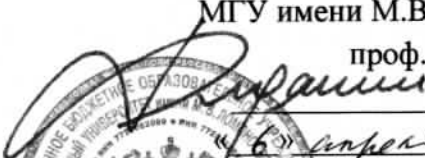


«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор – начальник
Управления научной политики
и организации научных исследований
МГУ имени М.В.Ломоносова,
проф. А.А.Федянин


«6» апреля 2016 года



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» о научно-практической ценности диссертационной работы Петрова Алексея Михайловича на тему «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02. – биофизика и 03.03.01 – физиология

Актуальность темы. Диссертационная работа А.М.Петрова посвящена исследованию важнейшего химического ингредиента фосфолипидных биомембран - холестерина, его участию в структурно-функциональных перестройках синаптических мембран при разных режимах секреторной активности нервных терминалей синапсов. В настоящее время наши знания о свойствах и функционировании пресинаптических мембран, в основном, ограничены данными о встроенных в них функциональных белках - каналах или рецепторах, как важнейших участниках процессов секреции медиатора. Между тем, сложные процессы экзо-эндоцитоза везикул в терминалях предусматривают перестройки и липидного матрикса всех мембранных компонентов. Очевидно, что важную роль в таких липидных перестройках должен играть и холестерин, обладающий множеством важных для мембран функций. Помимо хорошо известной способности стабилизировать липидный бислой, весьма интригующей и малоизученной остается активность холестерина в создании т.н. липидных рафтов (функционально сгруппированных в мембране липидно-белковых кластеров), а также - в деформациях мембран при везикулярных перестройках. Как эти и другие свойства холестерина проявляют себя во время экзо-эндоцитозных перестроек мембран терминалей - весьма важный и крайне мало изученный вопрос современной физиологии синапсов. В связи с этим не вызывает сомнений большая актуальность темы диссертации А.М. Петрова и проведенных автором исследований.

Структура и содержание работы. Диссертационная работа включает традиционные главы, введение, обзор литературы, методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературы (из 483 источников). Общий объем диссертации - 277 страниц. Обзор литературы хорошо иллюстрирован и дает полное представление о пресинаптических везикулярных процессах, метаболизме холестерина и его роли в синаптических процессах. В главе методы исследования дано подробное описание использованных автором электрофизиологических и оптических методов, в том числе - микроскопического отслеживания флуоресцентного окрашивания везикул и иммунофлуоресцентного окрашивания синаптических белков (синтаксина1, синаптофизина, TRPV1-каналов). Следует подчеркнуть, что использованные методы адекватны поставленным задачам, а результаты корректно статистически обработаны. Глава «Результаты и их обсуждение» хорошо иллюстрирована графиками, примерами оригинальных сигналов, что позволяет оценить качество электрофизиологических и оптических записей. В главах диссертации поэтапно прослежены: а) роль холестерина в формировании синаптических липидных рафтов, в вызванном экзоцитозе, эндоцитозе и транспорте синаптических везикул, спонтанном экзоцитозе и внутриклеточной сигнализации, невезикулярном освобождении нейромедиатора, б) влияние окисления холестерина и экзогенно апплицируемого оксистерола на синаптические липидные рафты и пресинаптические везикулярные процессы. Следует отметить, что собственно обсуждение результатов дано очень компактно и не содержит избыточных спекуляций и отступлений от полученных фактических результатов. Заключение и выводы полно отражают ключевые результаты работы.

Содержание диссертации полностью соответствует указанным специальностям – физиология (03.03.01) и биофизика (03.01.02)

Содержание автореферата полностью отражает полученные результаты и выводы диссертации.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. По теме работы автором опубликовано 57 работ, в числе которых 1 монография и 18 статей в изданиях, рекомендованных ВАК (включая высокорейтинговые журналы Biochimica et Biophysica Acta (BBA),- Molecular and Cell Biology of Lipids; Biochemical and Biophysical Research Communications; Neuroscience; Journal of Physiology; Journal of Neuroscience). В большинстве статей Петров А.М. является первым или последним корреспондирующим автором, сделавшим основной вклад и руководившим исследованием.

Научная новизна полученных результатов и выводов. Число новых фактов и впервые описанных в данной работе феноменов составляет длинный список. По существу, все основные результаты работы отличает новизна и приоритетный характер. Среди них - новые данные о роли холестерина и продуктов его окисления на пресинаптические процессы. Впервые показано, что холестерин способствует формированию липидных рафтов в нативных мембранах нервно-

мышечных синапсов, причем в регионах, приспособленных для эффективного протекания экзо- и эндоцитоза везикул. Новыми являются и сведения о том, что истощение даже небольшой части холестерина плазматических мембран ведет к снижению пула везикул, участвующих в передаче при интенсивной активности, а вымывание холестерина из везикул коррелирует с подавлением эндоцитоза и рециклирования везикул. В работе выявлены ранее не известные механизмы, ответственные за увеличение спонтанного экзоцитоза в ответ на существенное уменьшение уровня мембранного холестерина. Наконец, в диссертационной работе А.М.Петрова проведено пионерское исследование значения холестерина в невезикулярном освобождении ацетилхолина из двигательных нервных окончаний. Обнаружен феномен значительного усиления некантовой секреции в ответ на удаление небольшой части холестерина мембран, а также впервые расшифрован его механизм.

Таким образом, в диссертационной работе Петрова А.М. получен большой объем принципиально новых результатов, имеющих приоритетный характер, позволяющих по-новому представить влияние холестерина и продуктов его окисления на пресинаптический везикулярный цикл и процессы освобождения нейромедиатора.

Достоверность и обоснованность положений, результатов и выводов. Диссертационное исследование Петрова А.М. выполнено с помощью адекватных и современных электрофизиологических и оптических методов. В частности, использовались микроэлектродные методы регистрации постсинаптических сигналов -токов/потенциалов концевой пластинки, что позволило автору - хотя и косвенно, но с высокой степени точности судить об освобождении квантов нейромедиатора из окончаний. Наряду с этими методами были использованы и флуоресцентные FM красители (и их «тушители»), позволяющие непосредственно следить за процессами экзо- и эндоцитоза везикул. Сопоставление оптических и электрофизиологических данных, грамотно проведенное в диссертационной работе, позволило выяснить детали поведения пулов синаптических везикул. Правильность статистической обработки и анализа данных, полученных в диссертационной работе, не вызывает сомнений. Следует также отметить, что ряд впервые обнаруженных автором феноменов позднее был подтвержден независимыми исследованиями, выполненными на других объектах.

Научно-практическая значимость полученных результатов и выводов. Обнаруженные в исследовании феномены и механизмы связаны с фундаментальными процессами, протекающими в химических синапсах – это экзо- и эндоцитоз, трафик синаптических везикул, организация везикул в пулы, формирование липидных рафтов. Поэтому полученные результаты и выводы имеют большое значение для фундаментальной физиологии и биофизики синаптических процессов. В работе развиты новые представления о роли

важнейшего компонента плазматических мембран – холестерина и его окисленных производных – в функционировании мембран пресинаптических терминалей синапсов. Результаты работы имеют и прикладное значение, в первую очередь – для клиники нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся снижением содержания холестерина. Полученные в работе данные – серьезный повод для критической оценки широкого использования препаратов – статинов, снижающих продукцию холестерина, учитывая обнаруженную автором высокую чувствительность процессов секреции медиатора к концентрации холестерина в мембране.

Таким образом, диссертационная работа Петрова А.М. вносит существенный вклад в современные фундаментальные знания о механизмах секреции медиатора в синапсах. В работе впервые экспериментально доказываются и обосновываются принципиально новые представления о роли холестерина и его окисленных производных в функционировании плазматических и везикулярных мембран синаптического аппарата.

Рекомендации по использованию результатов и выводов. Полученные в диссертационном исследовании Петрова А.М. данные могут представлять интерес для научных коллективов, занятых в области биофизики и физиологии синаптических и мембранных процессов, в частности, это: кафедра физиологии человека и животных, кафедра биофизики, кафедра медицинской биофизики (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва); лаборатория функциональной нейрохимии (Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, г.Москва); лаборатория функциональной синаптологии (ФГБНУ «Научный центр неврологии», г. Москва); лаборатория клеточной биологии рецепторов, отдел молекулярной нейробиологии (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г Москва); лаборатория функциональной биохимии нервной системы, (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва); лаборатория биофизики синаптических процессов, (Институт эволюционной физиологии и биохимии им И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург) сектор молекулярной физиологии клетки (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск)

Вопросы, возникшие при рассмотрении диссертации

1. Авторы обнаружили уменьшение вызванного выброса АХ и углубление депрессии ритмической передачи при частичном удалении мембранного холестерина (с помощью 1мМ МЦД). Считает ли автор это однозначным свидетельством нарушений (патологических сдвигов) механизма экзоцитоза в активных зонах плазматической мембраны? Не может ли незначительный, регулируемый клеткой выход активного холестерина из мембраны (моделируемый в данной работе с помощью МЦД) играть *регуляторную роль* в виде ограничения

расхода (экзоцитоза) везикул при одиночной и ритмической активности синапсов?

2. Автором показано, что существенное снижение уровня холестерина в плазматической мембране приводит к аномально высокой частоте спонтанной секреции, связанной с активацией НАДФ-Н-оксидазы, АФК и другими изменениями в терминалях. Остается не ясным, сохраняется ли при этом вызванный выброс АХ?

3. Учитывая высокую насыщенность везикул холестерином, выглядит логичным заключение, что обеднение холестерином везикул сопровождается более выраженной депрессией передачи. Однако непонятно, почему автор и другое явление - подавление эндоцитоза в постактивационный период прямо связывает с вымыванием везикулярного холестерина? Остается непонятным, как модифицированные везикулы, экзоцитирующие в ходе ритмического залпа (схема МЦД2) могут напрямую стать участниками постактивационного эндоцитоза и затормозить его? На наш взгляд, более вероятно, что использованная автором процедура загрузки МЦД в местах и во время активного эндоцитоза везикул, могла сделать доступными для действия МЦД специфические участки/структуры мембран, избирательно формирующиеся или активизирующиеся при эндоцитозе. Нарушением холестерина у структур/мембран в сайтах самого эндоцитоза (под действием МЦД) и может объясняется подавление эндоцитоза при последующих ритмических залпах.

4. Основной подход, использованный автором при изучении роли холестерина в данной работе, строился на выяснении того, как меняется секреция АХ при *дефиците* холестерина в составе плазматической и везикулярной мембран. Однако для адекватной оценки роли этого ингредиента, на наш взгляд, не менее важным было бы смоделировать и противоположные изменения – то есть перенасыщение, перегрузку мембран холестерином, - в особенности, учитывая широко распространенный в настоящее время синдром гипер-холестеринемии, характерный для пациентов с липидными расстройствами.

Изложенные выше вопросы и замечания несколько не умаляют высокую оценку и отмеченных достоинств диссертационного исследования. В целом, принципиальных замечаний к диссертационной работе Петрова А.М. не возникло.

Заключение

Таким образом, диссертация Петрова Алексея Михайловича представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук на тему «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний» по специальностям 03.01.02. – биофизика и 03.03.01 – физиология, выполненная при научном консультировании член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора А.Л. Зефирова, является научно-квалификационной работой, представляющей собой научное


достижение, связанное с раскрытием роли холестерина в экзо-эндоцитозом цикле синаптических везикул и процессах освобождения нейромедиатора из пресинаптических нервных окончаний, имеющее важное значение для развития биофизики и физиологии синаптических процессов. По своей актуальности, объему, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа 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 А.М. Петров заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02. – «биофизика» и 03.03.01 – «физиология».

Отзыв составлен доктором биологических наук, профессором кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова Балезиной Ольгой Петровной, обсужден и утвержден на заседании кафедры физиологии человека и животных, протокол № 8 от «4» апреля 2016 г.

Заведующий кафедрой
физиологии человека и животных МГУ
доктор биологических наук, профессор


/ А.А. Каменский/

Профессор кафедры физиологии
МГУ, доктор биологических наук
профессор


/О.П. Балезина/

Подпись профессора, д.б.н. А.А. Каменского и профессора, д.б.н. О.П. Балезиной
заверяю:



Проф., д.б.н. О.П. Балезина
119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Биологический факультет, Кафедра физиологии человека и животных,
тел.:8(495)9393355 , e-mail: balezina@mail.ru

С отзывом
ознакомлен
16.05.16 