

У Т В Е Р Ж Д А Ю

Ректор Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор



Созинов А.С.

2015 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний» выполнена на кафедре нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В период подготовки диссертации соискатель Петров Алексей Михайлович работал в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2008 г. до 2009 г. в должности ассистента кафедры нормальной физиологии, с 2009 г. до 2013 г. в должности старшего преподавателя кафедры нормальной физиологии, с 2013г по настоящий момент в должности доцента кафедры нормальной физиологии. В 2004 г. соискатель окончил с отличием ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина» по специальности 03.03.01 – физиология, в 2007 г. окончил очную бюджетную аспирантуру на базе кафедры нормальной физиологии в ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» по специальности 03.03.01 – физиология. "4" марта 2008 г. соискателю присуждена ученая степень кандидата биологических наук советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата (доктора) наук на базе Татарского государственного гуманитарно-педагогического университета и выдан диплом серия ДКН № 060305 от 16 мая 2008 г. Научный консультант – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Зефирин Андрей Львович, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой нормальной физиологии.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Научные положения и выводы диссертации основываются на результатах собственных исследований автора и исследований, выполненных под непосредственным

руководством автора и при его участии. Достоверность результатов исследования основана на использовании адекватных электрофизиологических, оптических методов и фармакологических подходов, современных теоретических представлений для интерпретации результатов экспериментов, корректной статистической обработке полученных данных и на достаточном объеме выборок.

В диссертационной работе Петрова А.М. получены пионерские данные о роли холестерина мембран в функционировании синаптического аппарата, в частности, процессов, обеспечивающих освобождение нейромедиатора из пресинаптических нервных окончаний. Впервые было показано, что в интактных поверхностных мембранах нервно-мышечных синапсов имеются скопления ганглиозидов GM1 (липидные плотники или рафты) в сайтах экзо- и эндоцитоза. Особенно высокое содержание скоплений ганглиозидов GM1 было обнаружено в синаптических везикулах. Также было показано концентрирование холестерина в мембранах нервно-мышечных контактов, удаление даже небольшой части которого снижало стабильность плотников. Впервые выявлено угнетение избирательно вызванного освобождения медиатора за счет уменьшения пула синаптических везикул, активно вовлекающихся в нейротрансдукцию, в условиях высокочастотной активности в ответ на удаление небольшой фракции холестерина из поверхностных мембран. Впервые показано блокирование эндоцитоза и рециклирования синаптических везикул при удалении части холестерина из мембран синаптических везикул, что приводило к истощению везикулярных пулов в ходе интенсивной активности. Впервые расшифрован зависимый от активных форм кислорода и кальция механизм усиления спонтанного экзоцитоза при удалении значительной части мембранного холестерина. Также приоритетными являются данные о зависимости механизма («полный» или «kiss-and-run») спонтанного экзоцитоза, вызванного истощением холестерина, от Ca^{2+} / фосфолипаза С-независимой активности протеинкиназы С. Впервые обнаружено усиление невезикулярного освобождения нейромедиатора, опосредуемое усилением активности везикулярного транспортера ацетилхолина и сопровождаемое закислением аксоплазмы, при удалении небольшой части мембранного холестерина. Причем удаление холестерина из мембран рециклирующих синаптических везикул еще больше потенцировало невезикулярное освобождение, что связано с блокированием эндоцитоза и, как следствие, накоплением везикулярных транспортеров ацетилхолина в пресинаптической мембране. Впервые показано снижение стабильности синаптических липидных рафтов и значительные изменения в синаптическом везикулярном цикле при ферментативном окислении части холестерина мембраны. Обнаружено, что после воздействия бактериальной холестерин оксидазы в ходе высокочастотной активности везикулы рециклирующего пула начинают освобождать медиатор через скоротечную пору слияния (kiss-and-run путь), а мобилизация везикул резервного пула значительно угнетается, вероятно, за счет нарушения кластеризации синаптических везикул. Впервые выявлена высокая биологическая активность оксистерола, 5 α -холестан-3-она, который в наномолярной концентрации, не затрагивая спонтанную секрецию, угнетал вызванный экзоцитоз, уменьшал популяцию синаптических везикул, активно вовлекаемых в нейротрансдукцию, и нарушал стабильность синаптических рафтов. Причем эффекты этого оксистерола на экзоцитоз и свойства мембран существенно ослаблялись при изменении исходного содержания мембранного холестерина.

Проведенное исследование расширяет наши представления о фундаментальных механизмах синаптической передачи, и в частности, о роли холестерина в протекании пресинаптических процессов, обеспечивающих освобождение нейромедиатора. Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на дефекты метаболизма холестерина как пускового фактора синаптической дисфункции, которая может способствовать нейродегенерации. Результаты исследования следует учитывать при фармакологической коррекции обмена холестерина с помощью ингибирующих его синтез агентов (статинов), особенно способных проникать через гематоэнцефалический барьер. Обнаруженные эффекты холестерин оксидазы (синтезирует 4-холестен-3-он) и 5 α -холестан-3-она на свойства синаптических

мембран и везикулярные процессы могут указывать на возможную роль оксистеролов в патогенезе ряда нейродегенеративных заболеваний, сопряженных с увеличением их продукции. Работа открывает новое поле для молекулярных исследований механизмов действия данных оксистеролов. Другой аспект работы, выявляющий тесную связь холестерина синаптических мембран с состоянием сигнальных молекул (НАДФН-оксидазы, TRPV-каналов, кальциневрина, протекиназы С) расширяет наши представления о холестерине как о дирижере процессов внутриклеточной сигнализации. Содержание холестерина в синаптических мембранах и продукция оксистеролов может существенным образом изменяться не только при патологических состояниях, но и в процессе развития, старения и в результате изменения режима синаптической активности. Следовательно, изменения содержания холестерина и / или продукции оксистеролов вследствие физиологических или патологических причин могут существенно перестраивать функционирование синаптического аппарата. Результаты исследования будут интересны широкому кругу специалистов, занятых в области биофизики, физиологии, нейробиологии и фармакологии.

Диссертация выполнена по биологической отрасли науки на стыке двух специальностей, биофизика 03.01.02 (в частности, биофизика мембран) и физиология 03.03.01 (в частности, исследование механизмов функционирования клеток и исследование закономерностей функционирования основных систем организма), и полностью им соответствует. Основное содержание диссертационного исследования полно отражено в научных трудах, опубликованных соискателем (18 статьях в ведущих рецензируемых журналах, 1 монографии, 1 главе в коллективной монографии, 6 статьях в сборниках, 31 тезисе).

Диссертация «Роль холестерина в везикулярном цикле и процессах освобождения медиатора из двигательных нервных окончаний» Петрова Алексея Михайловича полностью отвечает требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, и рекомендуется к публичной защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.01.02 – биофизика и 03.03.01. – физиология.

Заключение принято на заседании кафедры нормальной физиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Присутствовало на заседании 13 чел. Результаты голосования: «за» - 13 чел., «против» - нет, « воздержались» - нет, протокол № 363 от «5» ноября 2015г.

Председатель заседания,
д.б.н., профессор

Р.Р. Нигматуллина

Секретарь заседания,
Ст. преп., к.б.н.

— А.Р. Гиниатуллин

