

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.225.02,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» МИНИСТЕРСТВА НАУКИ И
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, ПО
ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 8.06.2022 № 14

О присуждении **Закирьяновой Гузалие Фаритовне**, гражданке РФ,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы» по специальностям 1.5.2 – биофизика, 1.5.5 – физиология человека и животных принята к защите 30 марта 2022 г. (протокол заседания № 10) диссертационным советом 24.1.225.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский Научный Центр Российской академии наук» (ФИЦ КазНЦ РАН) Министерства образования и науки Российской Федерации 420111, г. Казань, ул. Лобачевского д. 2/31 (приказ Минобрнауки РФ №788/нк от 09.12.2020 г.).

Соискатель, Закирьянова Гузалия Фаритовна, 12.11.1992 года рождения, в 2015 году окончила ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет с присвоением степени бакалавра по направлению подготовки «Биология». В 2017 году соискатель окончила ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по направлению подготовки 06.06.01 «Биология» по профилю «Нейробиология, психофизиология» с присвоением квалификации магистр. В 2021 г. окончила

очную аспирантуру при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Казанском институте биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (КИББ ФИЦ КазНЦ РАН) по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки» по специальности «Физиология». Закирьянова Г.Ф. с 2017 года по настоящее время работает в лаборатории биофизики синаптических процессов ФИЦ КазНЦ РАН в должности младшего научного сотрудника.

Диссертация Закирьяновой Г.Ф. выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов ФИЦ КазНЦ РАН Министерства науки и высшего образования РФ.

Научный руководитель – доктор биологических наук, Петров Алексей Михайлович, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов ФИЦ КазНЦ РАН.

Официальные оппоненты:

1. **Мухина Ирина Васильевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород;

2. **Богодвид Татьяна Халиловна** – доктор биологических наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Поволжский государственный университет физической культуры, спорта и туризма», г. Казань.

Оба оппонента дали положительные отзывы на диссертационную работу Закирьяновой Г.Ф.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва в своем

положительном отзыве, подписанном д.б.н., профессором кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ Балезиной О. П. и заведующим кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, д.б.н., профессором Каменских А. А., указано, что диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. является научной квалификационной работой, выполненной на высоком уровне с использованием современных адекватных методов, позволивших получить многочисленные новые научно-значимые факты. Отмечается, что полученные соискателем данные представляют теоретический интерес, а также, несомненно, важны для фармакологии и медицины и могут представлять собой основу для разработки новых фармакологических и терапевтических подходов для лечения различных мышечных патологий.

Соискатель имеет 20 опубликованных работ, 11 из которых опубликованы в журналах, индексируемых в международных информационно-аналитических системах научного цитирования, входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК: основные результаты диссертационной работы полностью опубликованы в 3 статьях, в которых Закирьянова Г.Ф. является первым автором. Общий объем опубликованных по теме диссертации работ составляет 138 страниц. Работы написаны соискателем в соавторстве с другими исследователями, личный вклад диссертанта заключается в выполнении основной части экспериментов, их математической обработке, в анализе литературных данных и обобщении полученных результатов. Диссертационная работа не содержит недостоверных сведений об опубликованных соискателем работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. **Zakyrjanova G.F.** Early differences in membrane properties at the neuromuscular junctions of ALS model mice: Effects of 25-hydroxycholesterol / G.F. Zakyrjanova, A.R. Giniatullin, K.A. Mukhutdinova, E.A. Kuznetsova, A.M. Petrov // Life Sci. – 2021. – Vol.273. – P.119300.

2. Zakyrjanova G.F. Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism / G.F. Zakyrjanova, A.N. Tsentsevitsky, E.A. Kuznetsova, A.M. Petrov // Free Radic Biol Med. – 2021. – Vol.174. – P.121-134.

3. Zakyrjanova G.F. Olesoxime, a cholesterol-like neuroprotectant restrains synaptic vesicle exocytosis in the mice motor nerve terminals: Possible role of VDACs / G.F. Zakyrjanova, A.I. Gilmutdinov, A.N. Tsentsevitsky, A.M. Petrov // Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. – 2020. – Vol.1865, №9. – P.158739.

На диссертацию и автореферат поступило 9 отзывов:

от д.б.н., профессора, заведующего кафедрой общей физиологии СПбГУ Маркова Александра Георгиевича; от д.б.н., профессора, заведующего лабораторией функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН Гуляевой Натальи Валерьевной; от д.м.н., заведующего кафедрой нормальной физиологии с биофизикой Ярославского государственного медицинского университета Маслюкова Петра Михайловича; от д.б.н., заведующего лабораторией молекулярных механизмов нейронных взаимодействий Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН Зайцева Алексея Васильевича; от д.б.н., профессора Каримовой Руфии Габдельхаевной и к.б.н., доцента кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) Федерального университета Яковлева Алексея Валерьевича; от д.б.н., профессора, заведующего лабораторией физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова РАН Крылова Бориса Владимировича. Отзывы положительные, замечаний к оформлению и содержанию автореферата нет.

Отзыв от д.б.н., заведующего лабораторией миологии Института медико-биологических проблем РАН Шенкмана Бориса Стивовича содержал вопрос, касающийся возможных механизмов действия 25-

гидроксихолестерина на изменение количества фрагментов концевой пластинки. В отзыве от к.ф.-м.н, заведующего лабораторией молекулярной нейробиологии Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН Большакова Алексея Петровича задано несколько вопросов касательно влияния кальция на выброс нейромедиатора и использования флуоресцентных зондов, которые измеряют кальций и активные формы кислорода в синаптическом регионе, для оценки процессов, регулирующих выброс нейромедиатора из пресинаптического нервного окончания. В отзыве от к.б.н., старшего научного сотрудника лаборатории биофизики синаптических процессов Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук Большакова Константина Викторовича имеются ряд вопросов касательно: 1) специфичности 25-гидроксихолестерина к другим рецепторам, помимо LX-, NMDA-рецепторов и GPR183; 2) рассмотрения VDAC-канала в качестве белка плазматической мембраны; 3) изменения паттерна окрашивания LX-рецепторов после добавления метил- β -циклодекстрина и присутствия белка VDAC в плазматической мембране; 4) соответствия частоты 20 Гц физиологичному диапазону работы мышцы; 5) вклада ядерных LX-рецепторов в эффект 25-гидроксихолестерина; 6) специфичности 25-гидроксихолестерина и его сопоставления с другими гидроксихолестеринами; 7) физиологического смысла влияния воспалительных оксистериннов на нервно-мышечную передачу и о протекторным эффекте подавления нейротрансмиссии при боковом амиотрофическом склерозе.

В ходе защиты диссертации были высказаны замечания, касающиеся опечаток и употребления жаргонизмов. Закирьянова Гузалия Фаритовна согласилась со всеми замечаниями и аргументированно ответила на все вопросы, заданные в отзывах.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оппоненты являются высококвалифицированными специалистами в области биофизики синаптических и мембранных

процессов, физиологии нейротрансмиссии. Оппоненты имеют публикации в рецензируемых научных российских и зарубежных журналах, относящихся к теме диссертационной работы. Ведущая организация является признанным научным центром РФ, занимающимся фундаментальными и прикладными проблемами в нейробиологии, в том числе в области биофизики и физиологии синаптической передачи.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: Разработана новая концепция о регуляции нервно-мышечной передачи двумя холестерин-подобными соединениями: 25-гидроксихолестерином и олесоксимом, что расширяет представления об оксистеринах как о модуляторах физиологических процессов.

Доказано участие печеночных X (LX)-рецепторов и хлорного транспорта в регуляции освобождения нейромедиатора и мобилизации синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях диафрагмальной мышцы. Показано, что 25-гидроксихолестерин и олесоксим влияют на нервно-мышечную передачу за счет активации LX-рецепторов и стимуляции хлорного транспорта, соответственно. Доказано, что в мышечной модели бокового амиотрофического склероза на ранней стадии происходят нарушения свойств синаптических мембран; эти нарушения могут быть существенно ослаблены за счет применения 25-гидроксихолестерина.

Предложены новые сигнальные пути с участием LX-рецепторов и хлорного транспорта, приводящие к активации или торможению синаптической передачи в нервно-мышечном контакте.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Раскрыты механизмы модуляции нервно-мышечной передачи со стороны 25-гидроксихолестерина и олесоксима, показан эффект 25-гидроксихолестерина на свойства синаптических и внесинаптических мембран в диафрагмальной мышце в норме и в модели бокового амиотрофического склероза.

Доказано, что в субмикромольных концентрациях 25-гидроксихолестерин потенцирует синаптическую передачу, а олесоксим, наоборот, угнетает. Эти производные холестерина запускают сигнальные пути с участием LX-рецепторов и хлорного транспорта, которые ранее не были известны в нервно-мышечном синапсе. Также доказано, что 25-гидроксихолестерин способен восстанавливать биофизические свойства синаптических мембран, нарушения которых обнаружены в модели бокового амиотрофического склероза. Применительно к проблематике диссертации результативно использованы биофизические методы (микроэлектродные измерения мембранных потенциалов и флуоресцентная микроскопия), фармакологические подходы, также экспериментальные животные с моделью бокового амиотрофического склероза.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что: определены направления эффектов двух клинически значимых холестерин-подобных молекул в главной дыхательной мышце: 25-гидроксихолестерина, образующегося в ходе воспалительных реакций, и олесоксима, синтетически полученного нейротрофического фактора. Полученные в ходе исследования результаты могут послужить основой для создания новых терапевтических подходов при лечении различных двигательных, в том числе нейродегенеративных заболеваний.

Оценка достоверности результатов исследования выявила обоснованность полученных данных. В экспериментальных работах корректно использовались биофизические методы: электрофизиологический, микроскопический, с применением флуоресцентных зондов, также применялись фармакологический подход и иммуногистохимия. Полученные данные обработаны статистически, а выводы обоснованы.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в составлении плана исследования, проведении экспериментальной работы, в том числе, в подготовке экспериментального материала, обработке и

интерпретации полученных результатов. Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора, либо на результатах, полученных совместно с сотрудниками ФИЦ КазНЦ РАН Ценцевиким А.Н. (частичное выполнение электрофизиологических экспериментов), Кузнецовой Е.А. (частичное выполнение экспериментов по оценке уровня цитозольного кальция в ответ на 25-гидроксихолестерин), со студентом К(П)ФУ Гильмутдиновым А.И. (частичное выполнение экспериментов по оценке влияния олесоксима на экзоцитоз).

В ходе защиты диссертации критических замечаний не было, при обсуждении возникли следующие вопросы:

- ✓ Как определяли текучесть мембран, методические подходы?
- ✓ Исследовали ли Вы механизмы действия низких концентраций?
- ✓ Считаете ли Вы, что высокие концентрации 25-гидроксихолестерина оказывают нейропротекторное действие?
- ✓ Как задействованы транзиторные Ca^{2+} каналы? Откуда поступал Ca^{2+} : извне или из внутриклеточных депо?
- ✓ Использовался ли в работе квантовый анализ вызванной секреции?
- ✓ Почему увеличение АФК не приводило к увеличению уровня ПОЛ?
- ✓ Как происходит активация инозитолтрифосфатных рецепторов?

Соискатель Закирьянова Гузалия Фаритовна ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию. Текучесть мембраны определялась косвенно с использованием различных красителей, чувствительных к липидному микроокружению. 25-гидроксихолестерин, действительно, усиливает секрецию нейромедиатора и при хроническом введении подавляет проявления ранних признаков синаптической дисфункции в модели бокового амиотрофического склероза, следовательно, его эффекты можно рассматривать как протективные. Транзиторное увеличение цитозольного кальция наблюдалось в течение минуты в ответ на 25-гидроксихолестерин и сохранялось при удалении кальция из внеклеточного раствора, в тоже время блокирование выхода кальция из

внутриклеточных депо через ИТФ полностью устраняло это увеличение, следовательно, 25-гидроксихолестерин вызывает выброс кальция из эндоплазматической сети. 25-гидроксихолестерин вызывал небольшое увеличение АФК, не приводящее к перекисному окислению липидов, следовательно, АФК в данном случае имеют сигнальное значение. Фосфолипаза С гидролизует мембранный фосфолипид (ФТИ_{4,5}Ф₂), с освобождением в цитоплазму ИТФ, который является лигандом для ИТФ-рецепторов эндоплазматической сети, активация этих рецепторов открывает кальциевый канал ИТФ-рецептора.

На заседании 8 июня 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Закирьяновой Гузалие Фаритовне ученую степень кандидата биологических наук за исследования эффектов 25-гидроксихолестерина и олесоксима на нервно-мышечную передачу и механизмов действия этих производных холестерина, что вносит вклад в решение важных научных задач по изучению регуляции синаптической передачи и созданию новых терапевтических подходов для коррекции нервно-мышечных заболеваний.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 6 докторов наук по специальностям 1.5.2 – биофизика (биологические науки), участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 3 человека по специальности 1.5.5 – физиология человека и животных (биологические науки), проголосовали: за - 17, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета,

академик РАН

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.



Гречкин Александр Николаевич

Пономарева Анастасия Анатольевна

10.06.2022 г.