

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Закирьяновой Гузалии Фаритовны «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2 - биофизика и 1.5.5 – физиология человека и животных (биологические науки)

Актуальность темы исследования обусловлена накоплением данных о том, что оксистеринны являются важными регуляторами многих клеточных процессов от гомеостаза холестерина до внутриклеточной сигнализации. В последнее время появляется все больше информации о действии оксистеринов на различные системы организма, однако мало данных об их влиянии на скелетную мышцу, функционирование которой может нарушаться при нейродегенеративных заболеваниях и воспалительных процессах. Концентрация 25-гидроксихолестерина в плазме увеличивается в ходе иммунного ответа и при боковом амиотрофическом склерозе. Исследование механизмов его действия потенциально может служить основой для создания терапевтических подходов для коррекции работы мышц при патологиях. Олесоксим – это оксистерин, полученный синтетически, он является нейропротектором, применяемым в преклинических исследованиях различных нейродегенеративных заболеваний в качестве ингибитора митохондриальной транзитной поры. В диссертационной работе Закирьяновой Г.Ф. было показано, что этот оксистерин может также влиять и непосредственно на синаптическую передачу. Кроме того, результаты работы выявили пути сигнализации, которые ранее не были известны. Еще одним важным разделом в экспериментальной работе являются данные о нарушениях свойств мембран при боковом амиотрофическом склерозе, что достоверно положительно корректировалось 25-гидроксихолестерином. Диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. является актуальным исследованием и имеет важное фундаментальное и прикладное значение, расширяющие понимание о действии оксистеринов как модуляторов синаптической передачи в скелетной мышце.

Научная новизна работы свойственна каждому разделу полученных результатов. Автором впервые было показано участие LX-рецепторов в синаптической передаче в нервно-мышечном соединении. Также впервые был показан вклад хлорного транспорта в рециклирование синаптических везикул. Несомненно, эти результаты расширяют понимание о внутриклеточной сигнализации в синапсе. К настоящему времени все больше исследований посвящается системному влиянию оксистеринов, однако данных об их влиянии на нервно-мышечную передачу и пресинаптические процессы немного. В

диссертационной работе Закирьяновой Г.Ф. показаны эффекты 25-гидроксихолестерина и олесоксима на цикл синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях, что является доказательством того, что дериваты холестерина можно отнести к новому классу веществ, модулирующих работу скелетной мышцы.

Важным разделом как физиологии, так и медицины, является исследование мышечных заболеваний, одно из которых затронуто в диссертации соискателя, а именно боковой амиотрофический склероз. Данное нейродегенеративное заболевание приводит к атрофии и дисфункции скелетных мышц и чаще всего заканчивается летальным исходом в результате дисфункции главной дыхательной мышцы – диафрагмы, которая является объектом исследований диссертанта. Исходя из полученных результатов, при боковом амиотрофическом склерозе происходят нарушения свойств мембран, что может затрагивать различные сигнальные пути, работу мембранных белков и других посредников. В работе показано, что 25-гидроксихолестерин способен препятствовать этим альтерациям.

Вышеперечисленные основные результаты, несомненно, обладают научной новизной, имеют фундаментальное и прикладное значение и могут использоваться в создании терапевтических подходов.

Оценка объема, структуры и содержания работы. Диссертационная работа представлена на 155 страницах машинописного текста. Структура диссертации общепринятая, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы из 285 источников. Иллюстративный материал включает в себя 30 рисунков и 1 таблицу.

Во «Введении» (с. 7-13) автором определены актуальность работы; степень разработанности темы, цель и задачи исследований; показаны научная новизна; теоретическая и практическая значимость работы; представлены положения, выносимые на защиту; описаны методы исследования; степень достоверности и апробация результатов исследования, публикации по теме диссертации, объем и структура работы.

Обзор литературы изложен на 19 страницах. В первом разделе описан процесс синаптической передачи в нервно-мышечном соединении. Подробно расписан процесс экзо- и эндоцитоза синаптических везикул с участием целого ряда белковых молекул. Проведен детальный анализ процессов, протекающих на постсинаптической мембране в ходе электрогенеза, описана структура данной мембраны. Также в данном разделе упомянуты ключевые белки, обеспечивающие передачу сигнала, и холестерин как ключевой модулятор кластеризации и функционирования никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, которые индуцирует быстрые деполяризационные реакции, вызывая

возбуждение мембраны мышечных волокон. Во втором разделе показано разнообразие пулов синаптических везикул с точки зрения функциональных характеристик и структурных особенностей. Следующий раздел посвящен разбору нарушений в синаптической передаче при боковом амиотрофическом склерозе. В четвертом разделе говорится о роли холестерина в синаптической передаче. Остальные разделы описывают функциональное значение оксистеринов.

Детально описаны методы и объект исследования (с. 34-47). Помимо белых лабораторных мышей, в работе использовались мыши с моделью бокового амиотрофического склероза с экспрессией мутантной формы человеческой супероксиддисмутазы-1. Применялись электрофизиологический и оптический методы, а также фармакологический подход с использованием различных блокаторов и хелаторов. Использовались разнообразные флуоресцентные красители для наблюдения за процессами экзо- и эндоцитоза, уровнем вторичных посредников, оценки свойств синаптических мембран. Кроме того, в работе было проведено моделирование митохондриальной дисфункции.

В третьей главе (с. 48-97) представлены результаты экспериментальной работы. С применением электрофизиологических и оптических методов было показано, что 25-гидроксихолестерин и олесоксим в субмикромольных концентрациях разнонаправленно влияют на синаптическую передачу: 25-гидроксихолестерин ускоряет, а олесоксим замедляет этот процесс. Подробно описаны этапы исследования с применением различных агонистов и антагонистов, флуоресцентных красителей для раскрытия механизмов действия оксистеринов. Для 25-гидроксихолестерина обнаружен сигнальный путь с участием следующих посредников: LX-рецептор/рецептор эстрогена α / G_i -белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/фосфолипаза C/ Ca^{2+} /протеинкиназа C. В свою очередь, олесоксим увеличивает вход ионов хлора в терминаль через анионный транспортер, подобный VDAC, локализованный в пресинаптической мембране. В экспериментальной работе по исследованию свойств мембран при боковом амиотрофическом склерозе обнаружены нарушение липидных рафтов, увеличение перекисного окисления липидов, усиление встраивания церамида в мембраны, повышение уровня внеклеточного холина и фрагментация кластеров никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, что подавлялось в ответ на применение 25-гидроксихолестерина.

В главе «Обсуждение» (с. 98-114) автор подробно анализирует полученные результаты, сопоставляя их с уже известными литературными данными. В разделе «Заключение» обобщены все экспериментальные данные диссертационной работы, представлены подробные схемы в виде рисунков, раскрывающие механизмы действия 25-

гидроксихолестерина и олесоксима. Сформулированные выводы являются объективными, всесторонне обоснованными, согласуются с задачами и логически вытекают из результатов экспериментов. Диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. выглядит законченным исследованием и содержит новые научные результаты.

Автореферат диссертации (25 с) написан в лаконичной форме и в полной мере отражает сущность данной работы.

Степень обоснованности и достоверности полученных результатов обеспечивается корректным планированием экспериментов, применением большого спектра методов и подходов, логичная статистическая обработка данных, а также достаточное количество экспериментальных исследований. Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью отражают полученные результаты и отвечают поставленным задачам. Полученные данные прошли необходимую научную экспертизу в результате публикации в материалах конференций и в журналах, рекомендуемых высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации (ВАК РФ).

Всего опубликовано 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК, в 3-х из них описаны основные результаты диссертационной работы, а в 8-и отражена методическая часть, использованная в экспериментальной работе. Также результаты были представлены на 5-и всероссийских и 4-х международных конференциях.

Личный вклад соискателя в реализацию научной проблемы, объем обработанного материала не вызывает сомнений.

Достоверность выводов и практических предложений, сформулированных в диссертации не вызывает сомнений и подтверждается большим объемом полученного фактического материала с использованием современных методик. Выводы логически обоснованы и отражают результаты исследований.

Научно-практическая значимость работы определяется оценкой роли оксистеринов в нервно-мышечной передаче, а именно 25-гидроксихолестерина и олесоксима. Это подтверждает, что оксистерины обладают важным функциональным значением в различных системах организма, о чем свидетельствуют литературные данные других исследователей. Также были найдены новые сигнальные пути с участием LX-рецепторов, обнаружено участие хлорного транспорта в нейротрансфере. Кроме того, 25-гидроксихолестерин подавлял нарушения свойств мембран на ранней стадии бокового амиотрофического склероза. Таким образом, диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. является фундаментальным и прикладным исследованием, которое вносит вклад в расширение понимания процессов внутриклеточной сигнализации, с последующим

возможным применением результатов в клинических исследованиях. Материалы диссертации способствуют решению важной проблемы – лечению нервно-мышечных заболеваний, которые снижают качество жизни, приводя к мышечной слабости вплоть до остановки работы диафрагмальной мышцы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Материалы диссертации могут быть интересны для исследовательской работы различных научных подразделений, например, кафедры нормальной физиологии с биофизикой Ярославского государственного медицинского университета, лаборатории внутриклеточной сигнализации Института биофизики клетки Российской академии наук, кафедры общей физиологии Санкт-Петербургского государственного университета Института медико-биологических проблем РАН (Москва), кафедры физиологии человека и животных МГУ (Москва), лаборатория биофизики синаптических процессов Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург), кафедры нормальной физиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова и других.

Вопросы по диссертационной работе:

1. При оценке влияния на синаптическую передачу экзогенного 25-гидроксихолестерина учитывалась ли влияние эндогенного 25-гидроксихолестерина, продуцирующегося иммунными клетками?
2. На какие мишени рециклинга синаптических везикул может действовать протеинкиназа C в эффекте 25-гидроксихолестерина?
3. Как изменяется работа диафрагмальной мышцы при воспалительных процессах у человека и животных?
4. Автор пишет, что при боковом амиотрофическом склерозе происходит изменение свойств мембран, а 25-гидроксихолестерин может их корректировать. Какой механизм действия 25-гидроксихолестерина может лежать в основе этого эффекта? Почему 25-гидроксихолестерин имеет эффект на мембрану мышечной с моделью бокового амиотрофического склероза, а на мембрану обычных мышечных не действует?

Заключение

Диссертационная работа Закирьяновой Гузалии Фаритовны на тему «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы» является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне.

Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Результаты исследования достаточно отражены в публикациях. Оформление диссертации заслуживает высокой оценки, а содержание автореферата полностью отражает сущность данной работы.

По актуальности, использованию широкого набора методов, новизне, объему экспериментальных данных, научной и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (ред. от 11 сентября 2021 г.), а ее автор, Закирьянова Гузалия Фаритовна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2 - биофизика и 1.5.5 – физиология человека и животных.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук
(специальность 03.03.01 – физиология),
доцент кафедры медико-биологических
дисциплин Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Поволжский
государственный университет физической
культуры, спорта и туризма».

Адрес: 420010, РТ, г. Казань, Деревня Универсиады, д. 35.

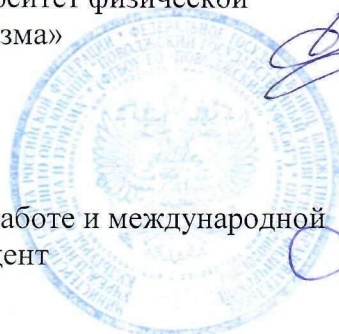
Телефон: +7 (843) 294 90 66

e-mail: tat-gain@mail.ru

Богодвид Татьяна Халиловна

16.05.2022

Личную подпись Богодвид Татьяны Халиловны
заверяю ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Поволжский
государственный университет физической
культуры, спорта и туризма»



Гарипова Алия Накиповна

Проректор по научной работе и международной
деятельности, к.б.н., доцент

Назаренко Андрей Сергеевич