

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора Мухиной Ирины Васильевны на диссертационную работу Закирьяновой Гузалии Фаритовны: «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы» по специальностям 1.5.2 – биофизика и 1.5.5 – физиология человека и животных, представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических

Актуальность темы выполненной диссертационной работы

Диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. посвящена актуальному вопросу нейробиологии, в частности синаптической передачи импульса в нервно-мышечном соединении, а также механизмам модуляции нейротрансмиссии в нервной системе. Известно, что потенциальными модуляторами нейротрансмиссии, в том числе на уровне пресинаптической мембраны, являются холестерин-подобные молекулы, что связано с высокой тропностью синаптических мембран к холестерину, который используется для построения липидных рафтов, где расположены важные белки, обеспечивающие экзо-эндоцитоз и рецепцию нейромедиатора. Несмотря на накопленные данные о роли холестерина и его аналогов в регуляции нервно-мышечной передачи, механизмы влияния производных холестерина на эффективность синаптической трансмиссии остаются всё ещё мало изученными. Важно отметить, что производные холестерина могут играть защитную и поддерживающую роль при развитии нейродегенеративных заболеваний, таких как боковой амиотрофический склероз, приводящих к тяжелой мышечной атрофии. Отсюда следует, что в борьбе с последствиями нейродегенеративных заболеваний важен поиск новых таргетных молекул для разработки методов коррекции возникающих нарушений в синапсах.

Все эти вопросы легли в основу цели научной работы диссертанта, которая была сформулирована следующим образом: изучить эффекты и механизмы действия двух производных холестерина (25-гидроксихолестерина и олесоксима) на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы.

В качестве объективных методов, выявляющих механизмы действия производных холестерина на синаптическую передачу, были выбраны современные электрофизиологические методы и методы флуоресцентного имиджинга, что позволило автору определить сигнальные молекулы и пути, задействованные в реализации эффекта 25ГХ и олесоксима.

Степень обоснованности, достоверности научных результатов

Научные положения диссертационной работы обоснованы большим количеством и разнообразием методов исследования. Положения и выводы диссертационной работы сформулированы на основе полученных результатов и отвечают поставленным задачам, а исследование соответствует паспорту специальностей биофизика и физиология человека и животных в области изучения механизмов регуляции синаптической передачи в нервно-мышечном

соединении с использованием электрофизиологических и флуоресцентных методов исследования.

Текст автореферата изложен в хорошем стиле, свидетельствует о высокой квалификации автора и в основном соответствует содержанию диссертационной работы (отсутствуют положения, выносимые на защиту). Замечаний к содержанию автореферата, снижающих научную и практическую значимость работы, не выявлено. К недостатку можно отнести присутствие в списке публикаций основных статей по диссертации статей, опубликованных ранее 2017 года, которые не отражают полученные в работе результаты, так как работа выполнена в период с 2017 по 2021 гг.

Основные результаты диссертации представлены в 11 печатных работах в журналах, включенных в системы цитирования Web of Science и Scopus, из них 6 полнотекстовых статей рейтинга Q1-Q2, полностью отражающих результаты диссертационного исследования. Не вызывает сомнений личный вклад автора в планирование, выполнение исследований, обработку материала, анализ и написание статей.

Научная новизна, теоретическое и научно-практическое значение диссертационного исследования

Автором диссертационного исследования вынесены на защиту следующие основные положения: (1) 25ГХ двунаправленно модулирует нервно-мышечную передачу, действуя пресинаптически через изменения в мобилизации СВ. Способность 25ГХ усиливать мобилизацию СВ зависит от ассоциированных с липидными рафтами LX-рецепторов, активация которых запускает сигнальный путь ЭРα/Gi-белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/ФЛС/Ca²⁺/ПКС путь; (2) 25ГХ способен препятствовать альтерациям свойств синаптических мембран у мышей с моделью БАС. В частности, 25ГХ предотвращает разрушение липидных рафтов при остром применении, а при хроническом введении дополнительно препятствует появлению признаков дисфункции нервно-мышечного соединения (повышение уровня внеклеточного холина, перекисное окисление липидов, фрагментация кластеров никотиновых ацетилхолиновых рецепторов); (3) Нейропротекторная молекула олесоксим ограничивает высвобождение нейромедиатора через активацию анион-транспортного белка пресинаптической мембраны, транспорт хлора через который подавляет экзоцитоз и мобилизацию синаптических везикул. В отношении представления положений следует отметить, что в третьем положении не стоит акцентировать на том, что олесоксим является нейропротекторной молекулой, автором в диссертации это не доказывается.

Для доказательства данных положений автором были получены следующие новые факты и разработаны гипотезы: (1) 25- гидроксихолестерин (эндогенный гидроксистерин) в высоких концентрациях способен усиливать мобилизацию синаптических везикул и последующий экзоцитоз, а полученный синтетическим способом олесоксим, наоборот, ограничивает этот процесс (2) сигнальный путь действия 25ГХ связан с активацией мембранных X-рецепторов печени (LXрецепторы), Gi-белка и его $\beta\gamma$ -димера, что приводит к активации фосфолипазы C (ФЛС) с последующим выбросом кальция из депо

и стимуляции протеинкиназы С (ПКС); (3) на досимптомной стадии у мышей с моделью БАС (mSOD 5 мыши) изменяются свойства синаптических мембран (снижение целостности липидных рафтов, увеличение текучести мембраны, перекисное окисление липидов), а 25ГХ способен устранять эти нарушения; (4) что олесоксим способен замедлять нервно-мышечную передачу, а анион-транспортный белок плазматической мембраны (предположительно VDAC), активируемый олесоксимом, участвует в регуляции экзоцитоза и мобилизации синаптических везикул; (5) индуцируемый олесоксимом механизм пресинаптического ингибирования связан с притоком ионов хлора в пресинаптическое нервное окончание, что указывает на существование хлор-зависимого угнетения нервно-мышечной передачи в синапсе мыши.

Результаты исследования расширяют представления о физиологических механизмах регуляции производными холестерина синаптической передачи в нервно-мышечном соединении. Уточнены данные о роли хлора в пресинаптическом механизме регуляции нервно-мышечной передачи.

С практической точки зрения, полученные данные могут быть использованы при разработке новых подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушениями в нервно-мышечной передаче импульсов. Раскрытие механизмов действия изучаемых стероидов позволило обнаружить новые пути регуляции нервно-мышечной передачи, что может быть применено в будущем при разработке методов модуляции синаптической передачи. Основываясь на полученных в работе фактах, можно утверждать, что оксистероиды являются важным классом нейромодуляторов, которые можно использовать для коррекции нервно-мышечных дисфункций.

Теоретические положения исследования могут быть использованы в научных исследованиях, в процессе обучения студентов биологических, медицинских и фармацевтических вузов.

Оценка объема, структуры и содержания работы

Диссертация традиционно изложена на 155 страницах машинописного текста и включает список сокращений, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, их обсуждение, заключение и выводы. Список литературы включает 285 источников. В работе представлены 1 таблица и 30 рисунков.

Обзор литературы изложен на 20 страницах диссертации и представлен основными сведениями о механизмах синаптической передачи в нервно-мышечном соединении в норме и при БАС; классификации и функциональном значении пулов синаптических везикул; роли холестерина в регуляции синаптической передачи; оксистероидов как особом классе производных холестерина. Обзор литературы написан грамотно, данные представлены в логической цепочке, позволяющей сделать наиболее полное заключение о состоянии проблемы в науке по выбранному направлению, что демонстрирует эрудицию автора в изучаемой проблеме.

Материалы и методы исследования. Описание методов очень подробное, особенно в части оптических методов исследования. Для

выявления механизмов был применен фармакологический подход с использованием агонистов/антагонистов. Сведения о статистике представлены в специальном. отделе и позволяют оценить их выбор в каждом конкретном случае.

Результаты и их обсуждение. Автором очень детально и логически представлены результаты исследования в экспериментальной Главе 3, которые имеют четкую структуру: небольшое введение в качестве задачи, которую автор решает в последующих исследованиях. В конце каждой подглавки есть небольшое заключение по полученным результатам. Автором проведен статистический анализ полученных результатов с использованием адекватных методов оценки достоверности различий.

Автором четко доказано, что иммунный оксистерин 25ГХ является мощным модулятором нервно-мышечной передачи и регулирует рекрутирование СВ в экзоцитоз. Причем показано, что эффекты этого оксистерина проявляются только при относительно интенсивной активности. Наномолярные концентрации 25ГХ подавляют нейротрансмиттерную передачу, тогда как микромолярные концентрации обладают стимулирующим действием, которое опосредуется активацией LX-рецепторов, связанных с липидными рафтами.

Результаты проведенных экспериментов указывают на то, что эти пресинаптические рецепторы могут запускать сигнальный путь ЭРα/Gi-белок/βγ-димер G-белка/ФЛС/Ca²⁺/ПКС. Кроме того, 25ГХ может действовать как прооксидант, увеличивая АФК в Ca²⁺-зависимой манере; далее, генерируемые АФК могут дополнительно способствовать экзоцитозу СВ. Этот LX-рецептор-зависимый путь может быть новым регуляторным механизмом, с помощью которого иммунные клетки, продуцирующие 25-ГХ, влияют на нейротрансмиттерную передачу и моторную функцию.

Также оказалось, что 25ГХ может предотвратить изменения свойств мембран (нарушение липидных рафтов, увеличение захвата церамида, перекисное окисление липидов), уровня холина и кластеризации nHP в НМС в модели БАС. Это указывает на возможное протективное значение 25ГХ при данном нейродегенеративном заболевании. Более того, НМС мышей с моделью БАС характеризовались высокой способностью связывать 25-ГХ. Следовательно, 25ГХ не только модулятор нервно-мышечной передачи, но и соединение, способствующее поддержанию структурных свойств нервно-мышечного синапса

С другой стороны, было обнаружено, что олесоксим может негативно регулировать нейротрансмиттерную передачу, подавляя вызванный экзоцитоз СВ и их рекрутирование в сайты экзоцитоза. Механизм, лежащий в основе действия олесоксима, может быть связан с активацией белка VDAC на пресинаптической мембране и увеличением проницаемости мембраны для 118 анионов (Cl⁻). Установление механизма подавления нейротрансмиттерной передачи, опосредованного олесоксимом, позволило обнаружить новый механизм пресинаптического ингибирования, основанный на изменении анионной проницаемости мембраны.

На основании данных, полученных в рамках диссертационного исследования, была сформулирована концепция о том, что два производных холестерина, действуя через отличные механизмы, могут разнонаправленно регулировать нервно-мышечную передачу. Это открывает новые возможности для направленной коррекции дисфункций нервно-мышечной передачи за счет применения 25ГХ и олесоксима.

В целом в описании результатов прослеживается логика изложения, написано грамотно.

Автор, обсуждая результаты в Главе 4, предлагал гипотезы с использованием большого количества цитируемой литературы, что позволило ему выдвинуть ряд предположений и выводов, логически вытекающих из собственных данных и данных литературы.

В конце обсуждения результатов автор демонстрирует схемы предположительных механизмов стимулирующего действия 25ГХ на высвобождение нейромедиатора в процессе экзоцитоза в НМС и VDAC-зависимой регуляции высвобождения нейромедиатора в НМС, а также определяет перспективные направления для дальнейших исследований производных холестерина в регуляции синаптической трансмиссии.

Заключение. В конце диссертационной работы автор делает короткое заключение, позволяющее сжато представить обсужденные результаты.

Выводы. По результатам диссертационной работы автором было сделано 4 вывода. В целом выводы соответствуют поставленным 4-м задачам. В первом выводе, вероятно, допущена ошибка в изложении материала: 25ГХ оказывает разнонаправленный эффект на нейротрансмиттерную передачу при умеренно-частотной активности: в низких концентрациях потенцирует, а в высоких угнетает секрецию нейромедиатора и экзоцитоз синаптических везикул.

По тексту диссертации и изложения материала имеется ряд замечаний, которые изложены в отзыве по мере их встречаемости, однако замечания не имеют критического значения при оценке значимости достигнутых результатов в диссертационной работе Закирьяновой Г.Ф.

Вопросы:

1. Чем обусловлен дозозависимый эффект 25-гидроксихолестерина при изучении экзоцитоза?
2. Почему при низкочастотной стимуляции наблюдается угнетение экзоцитоза 25-гидроксихолестерином?
3. Каков предположительный механизм нейропротекторного действия олесоксима с точки зрения выявленных Вами механизмов?
4. Каким образом 25ГХ может действовать одновременно как прооксидант, увеличивающий АФК, стимулирующие экзоцитоз СВ, и как антиоксидант, предотвращающий изменения свойств мембран, в частности перекисное окисление липидов?
5. Что означает выражение «в Ca^{2+} -зависимой манере»?

Заключение:

Диссертационная работа Закирьяновой Гузалии Фаритовны на тему: «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании проведенных автором исследований разработаны новые теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как значимое научное достижение. По актуальности, достоверности результатов, опубликованных в рецензируемых международных журналах, степени обоснованности научных положений и выводов диссертационная работа соответствует требованиям 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 достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2 – биофизика и 1.5.5 – физиология человека и животных.

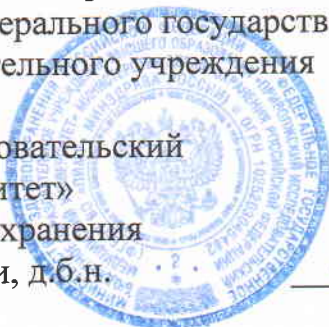
19 мая 2022

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


Мухина И.В.

603005, г. Нижний Новгород,
пл. Минина и Пожарского, 10/1.
Тел. 8(904)797 55 50
e-mail mukhinaiv@mail.ru
Сайт организации: <http://pimunn.ru/>

Подпись Мухиной И.В. заверяю
Ученый секретарь федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Приволжский исследовательский
медицинский университет»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации, д.б.н.




Андреева Н.Н.