

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор – начальник
Управления научной политики
МГУ имени М.В. Ломоносова,
профессор А.А. Федянин



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

о научно-практической ценности диссертационной работы Закирьяновой Гузалии Фаритовны на тему «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы», представленной 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. Диссертационная работа Г.Ф.Закирьяновой посвящена исследованию роли дериватов холестерина в модуляции периферической нервно-мышечной передачи у скелетных мышц. Холестерин и его окисленные формы являются важными модуляторами активности синапсов, в том числе – процессов нервно-мышечной передачи в скелетной мускулатуре животных и человека. В последние года исследованию роли дериватов холестерина в синаптической передаче уделяется все больше внимания, и с каждым годом появляется все больше доказательств того, что оксистерины (производные холестерина) можно рассматривать как отдельный класс веществ, участвующих в передаче сигнала от нервной системы к скелетной мускулатуре. Диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. посвящена исследованию механизмов действия *25-гидроксихолестерина (25ГХ)* и *олесоксима* на синаптическую передачу. Роль 25ГХ хорошо изучена в случае иммунного ответа и гомеостаза холестерина. Кроме того, обнаружено повышение концентрации данного эндогенного оксистерина при боковом амиотрофическом склерозе, в ответ на вирусы и липополисахариды. Однако не известно, как 25ГХ влияет непосредственно на нервно-мышечную передачу, что, безусловно

является актуальным вопросом, поскольку при воспалительных процессах и нейродегенеративных заболеваниях происходят нарушения работы скелетных мышц. В настоящее время *олесоксим* получен синтетически и используется в качестве нейропротекторного вещества при нейродегенеративных заболеваниях. Но по какому механизму *олесоксим* может осуществлять свои эффекты в периферической нервной системе и на уровне нервно-мышечных синапсов, до сих пор остается не известным. В связи с этим, исследования механизмов действия *олесоксима* в моторных синапсах, впервые предпринятые в диссертационной работе Закирьяновой Г.Ф., очевидно являются весьма актуальными и имеют большую теоретическую и практическую значимость.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. изложена на 155 страницах и состоит из 5 основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение. Логичным образом результаты обобщаются в заключении и выводах. Список литературы включает 285 источников. В работе присутствуют также 1 таблица и 30 рисунков.

Во введении обосновываются выбор темы исследования, научная новизна работы, научно-практическая значимость, определяются цели и задачи исследования, отображаются, положения, выносимые на защиту.

Глава 1 представляет собой обзор литературы. В ней подробно описан общий принцип передачи сигнала в химическом синапсе: устройство синаптического аппарата, процессы экзо-эндоцитоза, функциональное значение пулов синаптических везикул в процессе нейротрансмиссии. Рассмотрены нарушения синаптической передачи при боковом амиотрофическом склерозе и роль холестерина в регуляции синаптической передачи. Также описано физиологическое значение 25ГХ и *олесоксима*.

Во **2-ой главе автор** описывает материалы и методы. Для регистрации потенциалов на постсинаптической мембране использовался электрофизиологический метод с внутриклеточным микроэлектродным отведением. Для слежения за рециклированием синаптических везикул применялся краситель FM1-43. С целью раскрытия механизмов действия окистеринов использовался широкий набор различных агонистов и антагонистов к рецепторам и вторичным посредникам, например для LX-рецепторов, протеинкиназы C, фосфолипазы C и т.д. Также применялся широкий спектр флуоресцентных индикаторов на активные формы кислорода, ионы хлора, кальция и т.д., также использовались красители на липиды мембран с целью оценить свойства мембран

при боковом амиотрофическом склерозе. В качестве модели бокового амиотрофического склероза были использованы mSOD мыши с экспрессией мутантной формы человеческой супероксиддисмутазы-1. В методах описывается создание модели митохондриальной дисфункции с помощью ротенона, который нарушает работу электронной транспортной цепи митохондрий. Статистическая обработка результатов и количество экспериментов являются основанием для подтверждения достоверности.

В **3ей** главе представлены исследования, выполненные на высоком методическом уровне и получены результаты в соответствии с поставленными во введении целями и задачами. В первом разделе главы описано потенцирующее влияние 25ГХ на синаптическую передачу и механизм его действия, а именно был раскрыт новый путь сигнализации с участием LX рецепторов печени (LX-рецепторы), по литературным данным они являются ядерными и задействованы в регуляции гомеостаза холестерина. В работе Закирьяновой с применением иммунофлуоресцентного метода удалось обнаружить локализацию этих рецепторов в синаптической области, что говорит об их мембранной кластеризации. Далее с применением различных блокаторов и агонистов был раскрыт весь сигнальный путь от LX-рецепторов, активируемый 25ГХ: рецептор эстрогена α /Gi-белок/ $\beta\gamma$ -димер G-белка/фосфолипаза C/ Ca^{2+} /протеинкиназа C. Во втором разделе описаны результаты, где в экспериментах в качестве объектов использовались мыши с моделью бокового амиотрофического склероза и красители, чувствительные липидному окружению. Оказалось, что у мышей с моделью этого заболевания происходят нарушения свойств мембран при данном заболевании на ранней стадии, а именно происходят нарушения липидных рафтов, увеличивается перекисное окисление липидов, усиливается захват церамида, увеличивается уровень внеклеточного холина и фрагментация концевой пластинки. 25ГХ устранял все эти альтерации. В третьем разделе показано, что олесоксим способен угнетающе модулировать синаптическую передачу. Известно, что олесоксим действует на анионный транспортный белок VDAC митохондрий. Однако была обнаружена его локализация в мембранах нейронов, что подтверждается результатами диссертационной работы, где были получены иммунофлуоресцентные паттерны данного белка в синаптической области. Активация VDAC в дальнейшем способствует входу ионов хлора в нервную терминаль, что приводит к торможению рециклирования синаптических везикул. Стоит отметить, что роль хлорной проводимости в синаптической передаче именно в периферической нервной системе была показана впервые.

Глава 4 посвящена подробному обсуждению полученных результатов с приведением известных литературных данных об этих оксистеринах.

Диссертационную работу завершают заключение и выводы, которые полностью соответствуют цели и задачам исследования и отражают достижения проведенного исследования. Выводы и выносимые на защиту положения полностью отражают суть проделанной работы и соответствуют полученным данным. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы, в котором приведен список публикаций диссертанта.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна работы определяется расширением представления о функциональной значимости оксистеринов. Обзор литературы подтверждает, что данный класс веществ может вносить свой вклад в различные процессы, связанные с иммунной системой, метаболизмом, показано, что они также могут иметь нейропротективные эффекты, однако недостаточно сведений об их влиянии на нервно-мышечную систему. В рамках диссертационной работы Закирьяновой Г.Ф. были раскрыты механизмы действия 25ГХ и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении. 25ГХ усиленно вырабатывается при боковом амиотрофическом склерозе и в ходе иммунного ответа, что непосредственно затрагивает работу скелетной мышцы. Благодаря полученным результатам можно воздействовать на мишени, которые являются участниками сигнального пути, активация которого опосредуется 25ГХ. Такой терапевтический подход может позволить снизить негативное влияние нейродегенеративных заболеваний и воспаления на скелетную мышцу. Олесоксим – синтетически полученный оксистерин и используется как нейропротектор для лечения таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Хантингтона и Паркинсона. Известно, что протективный эффект олесоксима осуществляется за счет снижения образования митохондриальной транзитной поры. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты свидетельствуют, что данный оксистерин может иметь и другой механизм действия – через модуляцию транспорта ионов хлора в терминали. Этот механизм впервые обнаружен автором именно в синаптической передаче периферической нервной системы. Этот новый факт вносит большой вклад в понимание особенностей внутриклеточной сигнализации терминалей с участием стероидов. Весьма важно, что в работе впервые получены и данные о том, что при боковом амиотрофическом склерозе происходят негативные изменения свойств мембран, которые могут быть предотвращены воздействием 25ГХ. Вышеперечисленные основные результаты имеют научную новизну, вносят вклад в фундаментальные знания о функционировании синаптического аппарата и могут найти широкое практическое применение в клинике миотрофического склероза .

Достоверность результатов и выводов

Достоверность определяется корректностью поставленных задач, использованием современных материалов, широким набором методов, используемых в работе, сравнение полученных результатов с известными данными, а также публикациями результатов в рецензируемых журналах и представлением материалов исследования на всероссийских и международных конференциях.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Данные, полученные соискателем в ходе выполнения работы, представляют общенаучный теоретический интерес, дополняя представления о способах регуляции везикулярного экзоцитоза в современной синаптологии. Новые факты о роли стероидов и их рецепторов в моторных синапсах несомненно важны для фармакологии и медицины, связанной с нервно-мышечными болезнями. Полученные в работе новые факты расширяют представление о процессах внутриклеточной сигнализации, протекающих во время рециклирования синаптических везикул в моторных нервных терминалях нервно-мышечных синапсов. Понимание этих процессов может стать основой для разработки новых фармакологических и терапевтических подходов к лечению различных мышечных патологий.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По результатам работы опубликовано 20 работ, среди которых 11 статей в журналах из списка, рекомендованного ВАК и входящих в базу данных Web of science и Scopus. Также опубликованы 9 тезисов докладов, в число которых входят международные конференции по нейробиологии и физиологии .

Степень обоснованности полученных результатов

Изучив диссертационное исследование Закирьяновой Г.Ф., можно заключить, что работа является высококачественной, логично построенной и последовательной. Правильно спланированные эксперименты с применением электрофизиологического и оптического методов, где в последнем случае использовался очень богатый набор флуоресцентных красителей для слежения за рециклированием синаптических везикул, вторичными посредниками и свойствами мембран, позволили получить большой объем экспериментального материала, и провести его корректную статистическую обработку. Все это в совокупности является показателем достоверности полученных фактов и обоснованности выводов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов. Полученные в диссертационном исследовании данные могут представлять интерес для научных коллективов в области нормальной и патологической физиологии, нейробиологии, в частности, это: кафедра человека и животных (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва), лаборатория функциональной биохимии нервной системы (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва), лаборатория биофизики синаптических процессов (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, г. Санкт-Петербург), кафедра общей физиологии (Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, г. Санкт-Петербург), отдел общей патологии (НИИ общей патологии и патофизиологии г. Москва), кафедра нормальной физиологии (Казанский государственный медицинский университет, г. Казань),

Вопросы и замечания, возникающие при рассмотрении диссертации

1. Известно ли что-нибудь об эффектах самих эстрогенов в случае активации ими мембранных рецепторов эстрогена α (ЭР α) моторных терминалей?
2. Учитывая известное действие кардиостероидов на Р иР , в том числе, - и в моторных терминалях, возникает вопрос, является ли неядерный эстрогеновый рецептор единственной и главной мишенью 25ГХ? Могут ли и Р иР быть внутриклеточными мишенями 25ГХ, а активация ПКС и ускоренная мобилизация везикул запускаться выбросом Са через Р иР ?
3. Почему была выбрана концентрация олесоксима 0,4 мМ для его тестирования? Ведь она является скорее «промежуточной» между двумя противоположно действующими на экзоцитоз дозами другого стероида - 25 ГХ (0.1 и 1,0 мкМ)? Можно ли и у олесоксима ожидать двоякое дозозависимое действие на экзоцитоз, подобно 25 ГХ?
4. Остается не ясным (и не обсуждается автором) интересный факт, полученный в работе. Почему блокада неядерных LХ β -рецепторов не только предотвращает облегчающее действие 1мкМ дозы 25ГХ на экзоцитоз, но и *инвертирует* эффект, то есть приводит к тому, что «облегчающая» экзоцитоз доза в 1мкМ 25ГХ вызывает торможение экзоцитоза, подобно низким - 0,1 мкМ - дозам 25ГХ?
5. Хотелось бы более подробного обсуждения интересного нового факта, полученного в работе: какой механизм может лежать в основе торможения экзоцитоза при активации олесоксимом СГ-транспорта с участием канала VDAC? Может ли торможение экзоцитоза в этом случае быть связано с хлорной гиперполяризацией мембраны терминали и/или изменением осмотичности терминалей?

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

Заключение

Диссертационная работа Закирьяновой Г.Ф. является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком уровне, с использованием современных адекватных методов, позволивших поучить многочисленные новые научно значимые факты. Результаты рецензируемого исследования прошли необходимую апробацию и не вызывают сомнений. Публикации по теме диссертации раскрывают все положения,

выносимые на защиту. Автореферат адекватно отражает содержание исследовательской работы. Исходя из полученных результатов, заключение и выводы обоснованы.

Таким образом, по своей актуальности, объему, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Закирьяновой Гузалии Фаритовны «Механизмы действия 25-гидроксихолестерина и олесоксима на синаптическую передачу в нервно-мышечном соединении мышцы» полностью соответствует критериям 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 Г.Ф. заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.2 - биофизика и 1.5.5 – физиология человека и животных .

Отзыв составлен доктором биологических наук, профессором кафедры физиология человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Балезиной Ольгой Петровной, обсужден и утвержден на заседании кафедры физиологии человека и животных МГУ, протокол от «19» апреля 2022 г.

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

/А.А. Каменский/

Профессор кафедры
физиологии человека и животных 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:

Зам. ректора
И.П. Коручи

