

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Зариповой Ксении Асхатовны на тему «АТФ-зависимая регуляция сигнальных путей в скелетных мышцах при моделируемой гравитационной разгрузке», выдвигаемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.7. Авиационная, космическая и морская медицина

**Актуальность работы.** Диссертационная работа К.А.Зариповой посвящена актуальному и до сих пор практически специально не изучавшемуся вопросу современной мышечной физиологии – может ли, и, каким образом, пул синтезируемого в мышце АТФ, высвобождаясь в среду в условиях гипогравитации, принимать участие в запуске метаболических перестроек мышц, приводящих к мышечной атрофии. Несмотря на доказанное присутствие на мембранах мышечных волокон пуринорецепторов и паннексиновых каналов, возможное участие паннексинов в высвобождении миогенного АТФ и его роль в регуляции процессов атрофии остаются практически не изученными, хотя в других клеточных системах способность внеклеточного АТФ запускать огромный спектр процессов хорошо известна, в том числе - инициировать деструкцию, апоптоз и другие нарушения. В связи с этим, впервые предпринятая автором попытка оценить роль внеклеточного АТФ в запуске механизмов мышечной атрофии при мышечной разгрузке является чрезвычайно актуальной - как для фундаментальной мышечной физиологии, так и для поисков путей коррекции нарушений двигательного аппарата и мышечных атрофий, сопровождающих космические полеты.

ИМБП ВХ. № 08/2844(2)  
от «18» 09 2024 г. 1

Общая характеристика работы. Рукопись диссертации занимает 107 страниц и построена по традиционному плану: имеется введение, в котором дана формулировка актуальности и задач работы, ее новизны и научно-практической значимости. Далее следуют главы с описанием объектов и методов, результатов с их обсуждением, глава Заключение, Выводы (их всего 4) и список литературы, насчитывающий 248 источников.

Во Введении автор сразу формулирует рабочую гипотезу своей диссертации о возможном существовании специфических влияний на мускулатуру внеклеточного АТФ, высвобождаемого через паннексиновые каналы 1го типа при гипогравитационной разгрузке для активации пуринорецепторов P2Y-типа и формирования далее внутриклеточных Са-сигналов, что, в конечном счете приводит к развитию атрофических процессов. Здесь же дана схема предполагаемой цепи событий и ее участников. Завершается введение перечислением серий экспериментов, планируемых для решения поставленной задачи. На мой взгляд, их описание целесообразно было бы перенести в следующий раздел работы - Целей и решаемых задач работы.

Обзор литературы в диссертационной работе Зариповой занимает 20 страниц. В нем автор описывает ключевые каскады и ферменты, ответственные за белковые синтезы мышц в норме, и за подавление белковых синтезов и деградацию белков при разгрузке. Называются убиквитин-лигазы в качестве наиболее важных участников деструктивных процессов и деградации белков при атрофии, вызванной разгрузкой мышц.

Далее приводятся сведения об имеющихся в скелетных мышцах пуринорецепторах - ионотропных P2X-типа, и - метаботропных - P2Y1- и 2-типов, и об основных каскадах, запускаемых при их активации со стороны внеклеточного АТФ или продуктов его деградации.

При описании данных литературы по ключевому вопросу: что происходит при активации мышечных P2Y-рецепторов в случае их активации внеклеточным АТФ автор приводит данные о способности внеклеточного АТФ, активируя P2Y2-рецепторы регулировать процессы дифференцировки незрелых скелетных мышечных клеток. При этом отсутствует описание принципиально важной работы исследователей *Ito, Ruegg, Takeda, 2018* года, где были прослежены последствия хронического введения животным АТФ для постоянной активации P2Y2-рецепторов зрелых мышц – m. soleus и m. plantaris - и где было показано, что, благодаря постоянному присутствию внеклеточного АТФ и активации мышечных P2Y2 рецепторов в условиях интенсивной сократительной активности мышц в волокнах запускается mTOR-каскад реакций, приводящих к гипертрофии мышц. Отсутствие этих данных в литобзоре и, далее, – в обсуждении результатов диссертации снижает полноту объективного анализа полученных автором новых данных о возможностях и реальном спектре регуляторной активности внеклеточного АТФ при его активации P2Y2 рецепторов скелетных мышц.

Далее в обзоре литературы при описании канального белка паннексина1 представлена его молекулярная структура, свойства, приведены данные об экспрессии и локализации паннексиновых каналов на мышечных мембранах в Т-трубочках. Автор характеризует олигомеры паннексина1 как гексамеры, что действительно было широко принято в первые годы его открытия, однако в последние годы (2020-2024гг.) методами электронной криоскопии в ряде лабораторий мира показано, что комплекс белков паннексина1 представляет собой видимо не гекса-, а - гептамер.

Методическая часть диссертации. Для решения поставленных в диссертации задач автором была использована модель 3-х суточной функциональной разгрузки скелетных мышц задних конечностей крыс по известной методике Ильина-Новикова в модификации Morey-Holton. В методической части даны 3 рисунка, поясняющие специфику моделирования разгрузки

задних конечностей и схему введения специфических ингибиторов паннексина<sup>1</sup> (пробенецида), а также ингибиторов пуринорецепторов P2Y-типа, ингибиторов фермента P<sub>13</sub>K, которые *впервые* были апробированы в данной работе в качестве препаратов хронического действия, вводимых животным *in vivo*. В методической части даны схемы тестирования показателей атрофии изолированной *m. soleus*, извлекаемой из вывешенных в течение 3-х суток животных.

Объектом тестирования изменений метаболизма, и активности ферментов мышечных волокон служила медленная мышца голени - *m. soleus* крыс, наиболее чувствительная к ортостатической разгрузке. Эта мышца и ее перестройки действительно зарекомендовали себя как информативные для поисков причин и механизмов мышечной атрофии при длительной разгрузке и неупотреблении мышц.

В работе было проведено флуориметрическое определение уровня АТФ в пробах мышц. Использован большой набор современных биохимических методов определения активности мРНК убиквитин-лигаз, других ферментов (в фосфорилированном и дефосфорилированном состоянии), их мРНК, определение экспрессии белка паннексина<sup>1</sup>, белков пуринорецепторов, P<sub>3</sub>-рецепторов и других. Для этого использовались методы вестерн блоттинга, электрофореза белков с последующим вестерн блоттингом, метод ПЦР, метод обратной транскрипции РНК. Успешное освоение автором большого числа современных молекулярных биохимических методов работы с ферментами, РНК, определением экспрессии мышечных белков, и их адекватное использование при решении поставленных задач свидетельствует о высоком уровне научной и методической квалификации автора.

Статистическая обработка данных в работе также проведена на современном уровне с использованием таких критериев как тест Шапиро-

Уилка и критерий Краскела-Уоллиса. Соответственно, достоверность обнаруженных в работе сдвигов исследуемых параметров (активности ферментов, экспрессии мРНК и других) не вызывает сомнений.

Глава Результаты и обсуждение занимает 34 страницы текста и содержит 30 рисунков. Основным подходом, использованным в экспериментальной части работы, было хроническое блокирование гептамерных высокопроводящих каналов белка паннексина1 с помощью пробенецида (известного блокатора этих каналов), фармакологическая блокада пуринорецепторов P2Y1- и P2Y2-типа, а также - блокада P<sub>1</sub>3K, с тестированием специфических изменений активности ферментов и белковых синтезов, меняющихся при атрофии мышц вследствие 3х-суточной разгрузки мышцы. Тестируемыми параметрами были - падение массы мышцы, рост уровня экспрессии убиквитинлигаз, падение уровня синтеза белков, изменение активности ряда Ca-зависимых и других ферментов - GSK3β, MAPK, AMPK, CaN, имеющих отношение к процессам атрофии мышцы.

В результате было получено множество новых интересных данных, среди которых можно выделить четыре основных приоритетных факта, отличающихся новизной и представляющих несомненный научный интерес и значимость. Это, во-первых - обнаружение значимого роста уровня внутриклеточного АТФ в мышце к 3-им суткам мышечной разгрузки, во-вторых - впервые обнаруженная зависимость появления ряда показателей мышечной атрофии от активности паннексиновых каналов, в-третьих - зависимость большого числа показателей атрофии от активности пуринорецепторов P2Y-типа во время разгрузки, и, в-четвертых - зависимость ряда показателей атрофии и ряда Ca-зависимых ферментов, экспрессии P<sub>3</sub>R от активности P<sub>1</sub>3K при разгрузке.

Все это позволило автору сгруппировать полученные факты так, чтобы подкрепить заявленную во введении работы рабочую гипотезу - о

способности пула внутриклеточного АТФ накапливаться при разгрузке мышцы, высвобождаться через паннексиновые каналы и далее - путем активации P2Y-рецепторов - запускать каскад с участием PI<sub>3</sub>K, IP<sub>3</sub>-рецепторов и опосредуемых ими Ca-сигналов, которые, в свою очередь, могут соучаствовать в экспрессии генов определенных ферментов, в частности убиквитинлигаз. Одновременно при этом может происходить подавление белковых синтезов через сигнальный каскад ERK/p90RSK. Наконец, в работе было впервые установлено, что известные ранее изменения ряда Ca зависимых ферментов - CaN, CaMKII, GSK3β, а также активность MAPK, CaMKII и AMPK, изменяющиеся при разгрузке, – могут, - помимо Ca и других факторов, контролироваться еще и активностью PI<sub>3</sub>K, запускаемой при активации P2Y-рецепторов внеклеточным АТФ.

Таким образом, было впервые установлено, что на ранних этапах разгрузки мышцы наблюдается активность каналов паннексинов 1го типа, соучаствующих в высвобождении АТФ и развитии атрофических процессов с одновременной активацией метаболитных пуринорецепторов P2Y1- и P2Y2-типа, запуск с их участием разных сигнальных путей, в том числе - активности PI<sub>3</sub>K для реализации специфических проявлений мышечной атрофии.

Важно подчеркнуть, что в диссертации К.А.Зариповой были проведены замеры очень большого числа метаболических показателей мышц при мышечной разгрузке. В результате обнаружены новые молекулярные мишени, - такие как паннексиновые каналы, P2Y2-рецепторы, PI<sub>3</sub>K и IP<sub>3</sub>R как триггеры или соучастники атрофических перестроек мышц, что имеет фундаментальное значение для понимания механизмов атрофии мышц при разгрузке. В перспективе эти данные и новые мишени могут послужить для разработки новых способов фармакологической коррекции и профилактики атрофии при разгрузке мышц.

Безусловной заслугой данной работы является и то, что в ней впервые обращено внимание на важную роль миогенно высвобождаемого АТФ как внеклеточного сигнального фактора, аутокринно регулирующего мышечные P2Y-пуриновые рецепторы 1-го и 2-го типа, которые, как выяснилось, способны дифференцированно контролировать процессы атрофии, включая экспрессию убиквитинлигаз, отдельных белков и ферментов, характерных для состояния атрофии мышц. Кроме того, впервые показано, что не только при интенсивной сократительной активности или растяжении мышцы (как считалось до сих пор), но и при дискинезии, т.е. при выключении мышцы из активности могут срабатывать паннексиновые каналы мышцы как проводники АТФ в среду для пуринергической регуляции процессов атрофии мышц.

Наряду с этими многочисленными и очевидными научными достижениями данной работы, необходимо отметить и ряд имеющихся недостатков. Во-первых, в тексте «Результатов» работы вообще отсутствуют цифры оригинальных значений исследуемых параметров, будь то активность ферментов, которую принято предоставлять в молярных значениях, то же касается и содержания мРНК, рецепторных белков, уровня АТФ и других исследованных параметров метаболизма. Даже масса мышц во всем тексте диссертации дана лишь в %, при отсутствии оригинальных цифр в граммах, без учета веса животного и показателя поперечного сечения *m.soleus*, отнесенного к массе мышц, как это принято делать для более адекватной оценки этого важного показателя.

Во-вторых, в экспериментальной части работы обсуждению результатов и их детальному сопоставлению с данными литературы уделено недостаточно внимания. Поэтому многие важные вопросы и факты не получили должного анализа. В частности, остался без обсуждения вопрос, как согласуются обнаруженные автором атрофические перестройки мышцы при хронической 3х-суточной фармакологической блокаде каналов паннексина1 с данными

работы Saez и соавторов 2015г. (Saez et al., 2015), где у мышей с нокаутом по белку паннексину<sup>1</sup> в мышцах не было обнаружено ослабления процессов атрофии при денервации мышц по сравнению с атрофическими процессами в мышцах мышей дикого типа. Кроме того, наряду с предполагаемой, но прямо не доказанной ролью Ca-сигнала, опосредуемого IP<sub>3</sub>-рецепторами в реализации пуринергических влияний на атрофию, следовало бы обсудить возможную роль альтернативных источников подъема Ca при разгрузке, которые могли бы – либо быть сопряженными с активностью IP<sub>3</sub>-R, либо зависеть от активности внутриклеточного АТФ. Это касается активности РiP и утечки Ca из СР, утечки Ca из митохондрий и доказанного поступления Ca в волокна при разгрузке через медленные потенциал-зависимые Ca<sub>L</sub>-каналы мышцы.

В главе «Заключение», занимающей 2 страницы, автор суммирует полученные факты и подчеркивает, что впервые найдены новые терапевтические мишени для возможной разработки в будущем новых путей фармакологической коррекции атрофических процессов при мышечной разгрузке. Действительно, такая перспектива выглядит заманчивой, хотя и требует еще дальнейшего детального изучения и самих мишеней, и их возможных нетоксичных ингибиторов.

Выводы работы (их всего 4) описывают основные изменения, обнаруженные при блокаде каналов паннексина<sup>1</sup>, пуринорецепторов P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>-типов и P<sub>1</sub><sub>3</sub>K. Они, в целом, адекватно отражают основные полученные факты.

Результаты работы были неоднократно доложены автором на российских и международных конференциях и симпозиумах. Основные факты работы достаточно полно представлены также в 4-х опубликованных автором научных статьях в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций<sup>1</sup>



Автореферат диссертации адекватно отражает все главы диссертации К.А.Зариповой, хорошо и полно описывает основные полученные автором новые данные.

Большой экспериментальный материал диссертации и его интерпретация автором вызвали наряду с большим интересом и ряд следующих замечаний и вопросов.

1. Для адекватной оценки эффектов хронического действия пробенецида и блокаторов пуринорецепторов в качестве протекторов процессов атрофии на фоне разгрузки важно было - в качестве контроля - проследить возможные влияния этих препаратов и у мышц интактных животных без разгрузки, представив соответствующие показатели (массу мышц, уровень внутриклеточного АТФ, активность убиквитинлигаз, экспрессии мРНК и т.д), не в процентах, а в абсолютных значениях, чтобы их можно было сравнить с наблюдаемыми при разгрузке мышц без или на фоне введения препаратов.
2. Обнаруженное при разгрузке мышцы значительное повышение внутриклеточного уровня АТФ вызывает вопрос, оставшийся без обсуждения в работе – может ли внутриклеточный АТФ при повышении его уровня в миоплазме играть самостоятельную роль в регуляции АТФ- и/или АМФ-зависимых киназ, т.е. независимо от активации пуринорецепторов соучаствовать в запуске Са-зависимых атрофических процессов при разгрузке.
3. Отсутствие строгой корреляции в последствиях избирательной блокады паннексина1, блокады P2Y2-пуринорецепторов и активности P13K (судя по разной степени сдвигов массы мышц, экспрессии убиквитинлигаз, других показателей атрофии) порождает вопрос, какой же из факторов и мишеней в

цепи *паннексины* -АТФ-Р<sub>2</sub>У-Р- РI<sub>3</sub>К эффективнее других регулирует атрофию ?

4. Остается непонятным, по каким причинам автор утверждает, что блокада Р2У1-рецепторов не предотвращает развития процессов атрофии, несмотря на обнаруженные у Р2У1 рецепторов влияния на экспрессию убиквитин-лигаз и некоторые другие показатели атрофии?

5. Следовало бы пояснить читателю работы, почему автор называет опосредуемый Р<sub>3</sub>-R Са-сигнал – «слабым» – и как его активность соотносится с другими хорошо известными и параллельно действующими на ранних этапах разгрузки более сильными Са-сигналами, также управляющими Са-зависимыми ферментами и экспрессией генов в мышцах ?

6. В работе остался без осуждения вопрос, за счет каких механизмов тормозится повышение уровня АТФ на фоне блокады Р2У2-рецепторов или блокады фермента РI<sub>3</sub>К, несмотря на сохраняющуюся при этом разгрузку, то есть «неупотребление» мышцы и отсутствие в ней энергозатрат?


7. В работе имеются целый ряд опечаток и недоработок цитирования работ. Например, цитируемая на странице 66 работа (Takeda et al., 2018) не включена в «Список литературы» .

Высказанные замечания и возникшие вопросы ни в коей мере не умаляют общей высокой оценки проделанной автором работы.

Представляемая Ксенией Асхатовной Зариповой диссертационная работа ««АТФ-зависимая регуляция сигнальных путей в скелетных мышцах при моделируемой гравитационной разгрузке», выдвигаемая на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности **3.3.7. Авиационная, космическая и морская медицина**» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой автором на основании выполненных исследований получены новые приоритетные факты и

разработан ряд новых теоретических положений о роли АТФ и паннексиновых белков в пуринергической регуляции атрофических процессов в скелетной мышце при мышечной разгрузке.

Диссертационная работа К.А.Зариповой полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации N2842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.7-Авиационная, космическая и морская медицина.

Профессор кафедры физиологии человека и животных  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
Доктор биологических наук, профессор  / Балезина Ольга Петровна/

113233, г. Москва Ленинские горы д.1, строение 12, Биофак МГУ

телефон:89035641794 e-mail: [balezina@mail.ru](mailto:balezina@mail.ru)

Подпись д.б.н., профессора Балезиной О.П. заверяю: .....

18.09.2024