

Отзыв официального оппонента

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

Актуальность темы. Известно, что пребывание в условиях микрогравитации, а также длительный постельный режим, связанный с различными патологическими состояниями, приводят к развитию атрофии скелетных мышц, что является серьёзной медико-физиологической и психологической проблемой, значительно ухудшающей «качество жизни» пациентов. За последние годы достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных механизмов развития атрофических изменений в скелетных мышцах человека и животных. В частности, в недавних работах коллектива Б.С. Шенкмана показано, что изменения активности внутриклеточных сигнальных путей, приводящие к развитию мышечной атрофии, происходят в течение первых суток функциональной/гравитационной разгрузки скелетных мышц. Представленная диссертационная работа посвящена проверке предположения, что аденозинтрифосфат (АТФ) на ранних сроках (трое суток) гравитационной разгрузки может изменять активность кальций-зависимых сигнальных путей в гравитационно-зависимой камбаловидной мышце, что, в свою очередь, может приводить к развитию атрофических изменений. Актуальность диссертационной работы не вызывает сомнения, поскольку раскрытие новых фундаментальных механизмов, инициирующих мышечную атрофию, является важным для разработки адекватных способов её предотвращения и уменьшения негативных последствий её развития.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 107-ми страницах. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из: введения с описанием актуальности, цели, задач и новизны работы, обзора литературы, методической главы «Организация и методы исследования», главы «Результаты и обсуждение», заключения, выводов и списка литературы. В тексте диссертации также имеется список используемых сокращений. Диссертационная работа содержит 35 рисунков, 3 таблицы; список литературы состоит из 248 источников. В

литературном обзоре представлены данные о катаболической, анаболической и АТФ-зависимой сигнализации в скелетных мышцах, о паннексиновых каналах, пуриnergических рецепторах (P2Y1 и P2Y2), рецепторах инозитол-3 фосфата и их роли в скелетных мышцах.

В главе «Организация и методы исследования» представлено достаточно подробное описание проводимых экспериментов. Эксперименты выполнены на самцах крыс Wistar массой 180-200 гр. Для моделирования функциональной разгрузки гравитационно-зависимой камбаловидной (m. soleus) мышцы была применена широко используемая в мире методика антиортостатического вывешивания Ильина-Новикова в модификации Morey-Holton.

Поскольку диссертационная работа посвящена проверке гипотезы о том, что при функциональной разгрузке аденозинтрифосфат (АТФ) через паннексиновые каналы (Panx1) может выходить во внеклеточное пространство, далее взаимодействовать с каналами P2Y, которые, в свою очередь, способствуют активации рецептора инозитолтрифосфата (IP3R) в саркоплазматическом ретикулуме и высвобождению ионов кальция в цитозоль, в работе было проведено три серии экспериментов: по ингибированию паннексиновых каналов, ингибированию пуриnergических рецепторов P2Y2 и P2Y1, а также ингибированию фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) на фоне трехсуточной гравитационной разгрузки. Представлено достаточно подробное описание методической части этих экспериментов в главе «Организация и методы исследования». Далее следует подробное описание методических особенностей при исследовании полученного биоматериала методами ДСН-гель-электрофореза, Вестерн-блот анализа и ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В подразделе 2.5. описана методика определения содержания АТФ в мышце. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ REST 2009 v.2.0.12 и OpenOffice.org Calc.

Имеются два вопроса к методической части работы: (1) Почему была выбрана продолжительность моделирования гравитационной разгрузки равная трём суткам? (2) Почему в качестве так называемого «гена домашнего хозяйства» был выбран ген, кодирующий белок RPL19?

Научная новизна результатов и обоснованность основных положений диссертации, выносимых на защиту.

Первый этап работы заключался в проверке предположения о возможном увеличении содержания АТФ в *m. soleus* на фоне гравитационной разгрузки. Предположение нашло подтверждение, в частности, впервые обнаружено увеличение (более, чем на 30%) содержания АТФ в *m. soleus* крысы после трехсуточного моделирования гравитационной разгрузки. Сделано логичное допущение, что увеличение содержания АТФ является следствием практически полного отсутствия электрической и механической активности разгруженной камбаловидной мышцы, что наблюдается в течение первой недели гравитационной разгрузки. Таким образом, полученные результаты полностью подтверждают обоснованность первого положения, вынесенного на защиту, о том, что на ранних этапах функциональной разгрузки происходит накопление АТФ в разгруженной мышце.

Для оценки роли паннекссиновых каналов в регуляции катаболических и анаболических сигнальных путей в *m. soleus* крысы на фоне трехсуточной функциональной разгрузки они подверглись ингибированию пробенецидом. Эта часть работы была направлена на проверку предположения о возможном влиянии трафика АТФ через паннекссиновые каналы на регуляцию вышеуказанных сигнальных путей. Обнаружено, что ингибирование паннекссиновых каналов на фоне гравитационной разгрузки сопровождалось более низкой экспрессией генов таких катаболических маркеров как E3-лигазы MAFbx (участвует в убиквитинировании некоторых цитоскелетных белков) и E3-лигазы MuRF1 (участвует в убиквитинировании миозина) в сравнении с их экспрессией в *m. soleus* вывешенных крыс без введения пробенецида. Представлены доказательства о роли транскрипционного фактора миогенина в изменении экспрессии генов вышеуказанных E3-лигаз.

Имеются два вопроса к этой части работы:

(1) Известно, что киназа гликогенсинтазы-3 ($GSK3\beta$) участвует как в активации, так и в ингибировании mTOR [Evangelisti et al., *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020] – протеинкиназы анаболического сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Полученные в этой диссертационной работе данные об увеличении уровня фосфорилирования

GSK3 β и p70S6k (анаболического маркера сигнального пути mTORC1) свидетельствуют о согласованности или разнонаправленности выявленных изменений?

(2) Почему вес m. soleus крыс группы «Вывешивание 3 суток + пробенецид» был меньше, чем у контрольных животных несмотря на то, что в целом показатели исследованных анаболических и катаболических маркеров существенно не отличались от контрольных значений?

Замечание: не обсуждена роль значительного увеличения содержания фосфорилированной АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) в m. soleus вывешенных крыс с введением пробенецида (стр. 54).

Сделанное замечание и заданные вопросы не являются принципиальными, вопросы имеют дискуссионный характер. Полученные результаты подтверждают обоснованность положения, выносимого на защиту, об участии АТФ в регуляции экспрессии Е3-лигаз и активности анаболических сигнальных путей.

Цель следующего этапа работы заключалась в проверке предположения об участии пуриnergических рецепторов (P2Y1 и P2Y2) в изменении активности анаболических и катаболических сигнальных путей, в частности, в изменении экспрессии генов Е3-лигаз MuRF1 и MAFbx при развитии атрофических процессов в m. soleus крысы на фоне трехсуточной гравитационной разгрузки. Для этого было проведено ингибирование вышеуказанных рецепторов их селективными антагонистами – MRS2179 и AR-C 118925XX, соответственно. Анализ большого количества полученных экспериментальных данных, проиллюстрированных и описанных в главе 3.3 (Роль P2Y рецепторов в регуляции сигналинга в камбаловидной мышце при гравитационной разгрузке) (стр. 54-68), позволил автору сделать обоснованное заключение о роли P2Y1/2 рецепторов в регуляции анаболических и катаболических процессов, а также их участии в развитии атрофии m. soleus крысы на фоне гравитационной разгрузки. В частности, сделан вывод, что предотвращение атрофии разгруженной камбаловидной мышцы крысы на фоне ингибирования рецептора P2Y2 связано с подавлением интенсивности катаболических процессов и поддержанием интенсивности синтеза белка.

Имеется одно небольшое замечание к этой части работы: Трудно согласиться с утвердительным предложением автора на стр. 60: «Обе Е3-лигазы

участвуют в убиквитинировании белков, что ведёт к атрофии мышц». По-видимому, автор имел в виду повышенный уровень убиквитинирования, что может привести к атрофии мышц.

Заключительный этап работы был посвящен исследованию роли фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) в активации кальций-зависимых сигнальных путей и в изменении экспрессии E3-лигаз в *m. soleus* крысы после 3-суточной функциональной разгрузки. Для этого был применен ингибитор вышеуказанной киназы LY294002. Показано, что применение ингибитора LY294002 предотвращало увеличение уровня фосфорилирования Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой киназы II (CaMKII β), а также предотвращало увеличение содержания мРНК кальцинейрина (CaN, кальций- и кальмодулин-зависимой фосфатазы) в *m. soleus* крысы после 3-суточной гравитационной разгрузки. Полученные результаты позволили автору высказать предположение об участии фосфоинозитид-3-киназы в регуляции кальций-зависимых сигнальных путей в условиях гравитационной разгрузки. Обнаружено также, что ингибирование фосфоинозитид-3-киназы на фоне трехсуточной гравитационной разгрузки приводило к менее выраженной атрофии *m. soleus*, а также менее выраженному увеличению экспрессии генов E3-лигаз MuRF1 и MAFbx в сравнении с группой «чистого» вывешивания. Полученные результаты, на мой взгляд, подтверждают обоснованность третьего положения, выносимого на защиту, об участии фосфоинозитид-3-киназы в регуляции активности кальций-зависимых сигнальных путей в условиях гравитационной разгрузки.

Теоретическая и практическая значимость работы. Фундаментальное значение полученных результатов состоит в том, что они расширяют научные представления о молекулярных механизмах гравитационно-зависимой мышечной атрофии и, в частности, о роли АТФ в этом процессе. Практическое значение результатов исследования заключается в том, что они могут быть использованы для разработки новых препаратов, направленных, в частности, на ингибирование паннексиновых каналов или IP3-рецепторов, с целью предотвращения или уменьшения степени выраженности атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке.

Достоверность результатов исследования. Достоверность представленных в диссертационной работе результатов обусловлена использованием современных и адекватных для решения поставленных задач методов, а также грамотным применением методов статистического анализа данных. Научные положения и

выводы соответствуют поставленным задачам, обоснованы и согласуются с современными представлениями о молекулярно-клеточных и функциональных изменениях в скелетных мышцах вследствие длительного пребывания в условиях гравитационной разгрузки. Достоверность полученных результатов подтверждается опубликованными статьями в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах (4 статьи), зарегистрированным патентом № 2797216 («Способ предотвращения атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке»), а также выступлениями на научных конференциях.

Другие замечания:

- опечатка на стр. 17: «тогоб», по-видимому, должно быть «того».

- информация, представленная на схеме-рисунке 28 (стр. 68), осталась без должного описания в тексте диссертации.

- стр. 75, во фразе «Ингибирование P13K снижает уровень экспрессии маркеров сигнальных...», по-видимому, пропущено «не». Скорее всего, должно быть «Ингибирование P13K не снижает...».

- стр. 79, в выводе 3, во фразе «...синтеза белка. уровня...» вместо точки должна быть, по-видимому, запятая.

Вопросы, заданные выше и имеющие дискуссионный характер, а также сделанные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертации. Диссертационную работу Зариповой К.А. можно квалифицировать как исследование, внесшее большой вклад в понимание роли АТФ в регуляции анаболических и катаболических сигнальных путей при развитии скелетномышечной атрофии в условиях гравитационной разгрузки. Автореферат диссертации Зариповой К.А. отражает содержание диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Зариповой К.А. выполнена на современном научном уровне, содержит новые приоритетные данные, является полноценной квалификационной работой и соответствует пунктам 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842 для кандидатских диссертаций, а автор диссертации, Зарипова Ксения Асхатовна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата


биологических наук по специальности 3.3.7. Авиационная, космическая и морская медицина.

Главный научный сотрудник со степенью
доктора наук с возложением обязанностей
заведующего лабораторией структуры и
функции мышечных белков Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук (ИТЭБ РАН),
доктор биологических наук
(специальность 03.01.02 – биофизика)

 Вихлянцев Иван Милентьевич
02.09.2024

142290, Московская область, город Пушкино, улица Институтская, 3, ИТЭБ РАН,
тел.: +7925 287-40-90, e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com



Подпись: 
УДОСТОВЕРЯЮ-ЗАМ, ЗАВ. ОДОУ
Сваач С. Г. БАКАНОВА