



УТВЕРЖДАЮ
Директор ГНЦ РФ – ИМБП РАН
академик РАН

О.И. Орлов

«03» 06 2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации — Института медико-биологических проблем Российской академии наук

Диссертация «АТФ-зависимая регуляция сигнальных путей в скелетных мышцах при моделируемой гравитационной разгрузке» выполнена в лаборатории миологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации — Института медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Зарипова Ксения Асхатовна работала в ГНЦ РФ – ИМБП РАН в должности младшего научного сотрудника лаборатории миологии и обучалась в аспирантуре ГНЦ РФ – ИМБП РАН 2019 – 2023 гг.

В 2019 году окончила Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета по специальности «Биология».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2024 году ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Научный руководитель: Белова Светлана Павловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории миологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Результаты диссертационной работы «АТФ-зависимая регуляция сигнальных путей в скелетных мышцах при моделируемой гравитационной разгрузке» были обсуждены на секции «Космическая биология и физиология» Ученого совета ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол №14 от 22.11.2023 г.).

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертационная работа Зариповой К.А. посвящена исследованию АТФ-зависимые путей регуляции сигнальных путей скелетных мышц при их функциональной разгрузке.

Актуальность проблемы

Скелетная мышца может отвечать атрофией на состояние функциональной разгрузки, вызванное микрогравитацией, иммобилизацией, повреждением нерва, а также

длительным постельным режимом, связанным с различными патологическими состояниями. Атрофия скелетных мышц сопровождается снижением диаметра мышечных волокон, изменениями в содержании белка, снижением силы и увеличением утомляемости (Baldwin, Haddad, 2002; Fitts *et al.*, 2000; Fluck, Hoppeler, 2003). По современным представлениям, мышечная атрофия – результат увеличения деградации белка и снижения его синтеза (Glass, 2003; Vodine, Baehr, 2014; Мирзоев, Шенкман, 2018; Shenkman, 2020). При гипокинезии скелетные мышцы подвергаются атрофии в результате снижения или полного прекращения сократительной активности (Шенкман и соавт., 2020). Недавно было показано, что даже непродолжительное нахождение крыс в клетках ограниченного размера вызывает атрофию «быстрых» скелетных мышц и набор веса тела животного (Белова и соавт., 2021). Исследование причины атрофии мышц и разработка способов её профилактики актуальны, особенно когда большие популяции людей столкнулись с условиями ограничения подвижности, что оказало негативное влияние на состояние здоровья.

Для разработки способов предотвращения развития атрофического процесса необходимо выявить фундаментальные механизмы его инициирования. В недавних работах показано, что изменения внутриклеточных сигнальных путей происходят в первые дни и даже часы функциональной разгрузки мышц (Мирзоев, Шенкман, 2018; Shenkman, 2020). Известно, что экспрессия основных мышечных E3-убиквитинлигаз, участвующих в процессе деградации белка, значимо повышается через 24 часа разгрузки мышц и достигает пика к 3-м суткам (Kachaeva, Shenkman, 2012; Tyganov *et al.*, 2019; Shenkman, 2020). Поэтому имеет смысл исследовать ранние этапы развития этого процесса для разработки эффективных средств его профилактики, так как физиологические механизмы, активизирующие эти процессы не полностью понятны.

При длительной функциональной разгрузке мышц происходит накопление макроэргических фосфатов (Gupta *et al.*, 1989; Wakatsuki *et al.*, 1994) и ионов Ca^{2+} в мышечных волокнах (Ohira *et al.*, 1994; Shenkman, Nemirovskaya, 2008; Ingalls *et al.*, 1999). Однако недавно было обнаружено, что фосфорилирование сенсора аденозинтрифосфата (АТФ) АМФ-активируемой протеинкиназы (AMP activated protein kinase, AMPK) снижается на 1-3 сутки функциональной разгрузки (Vilchinskaya *et al.*, 2018). Кроме того, было показано, что разгрузка мышц вызывает снижение мембранного потенциала покоя в *musculus soleus*, и это сопровождается накоплением ионов кальция в саркоплазме уже после 3 дней разгрузки (Kravtsova *et al.*, 2015).

В экспериментах на культуре мышечных клеток было обнаружено, что в мышечных волокнах внеклеточный АТФ активирует мембранный сигнальный каскад, который в

конечном итоге, высвобождая Ca^{2+} , регулирует экспрессию генов (Casas *et al.*, 2014). Было показано, что АТФ, который оказывается в межклеточном пространстве, вызывает отставленное медленное высвобождение кальция через путь P2Y2-PLC-IP3 (Liu *et al.*, 2018; Casas *et al.*, 2014).

Возникает вопрос каким образом подобный механизм может работать в скелетных мышцах при атрофии? При функциональной разгрузке АТФ через паннексиновые каналы (Panx1) может выходить во внеклеточное пространство. Эти нуклеотиды затем могут взаимодействовать с каналами P2Y, которые в свою очередь активируют фосфоинозитид-3-киназу гамма (PI3K) в T-каналах мембраны и, в конечном итоге, рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R), находящиеся в ядре и саркоплазматическом ретикулуме. Активация IP3R может вызывать слабый сигнал высвобождения кальция как цитозольный, так и нуклеоплазматический, который способствует (возможно, с другими сигнальными каскадами) активации транскрипционных факторов, что приводит к изменению экспрессии ключевых генов скелетной мышцы. Решение этой задачи может существенно расширить представление о фундаментальных механизмах развития атрофических процессов в мышце и разработать подходы фармакологической коррекции негативных последствий гипокинезии и гравитационной разгрузки.

Новизна научных результатов

Впервые показано, что на ранних этапах функциональной разгрузки происходит накопление АТФ в мышцах. Паннексиновые каналы участвуют в транспорте АТФ при функциональной разгрузке мышц. Panx1-опосредованный транспорт АТФ влияет на экспрессию специфичных для мышц E3-убиквитинлигаз MuRF1 и MAFbx и регулирует сигнальные пути, контролирующие процессы трансляции и элонгации белка.

Впервые показано, что P2Y1/2 рецепторы участвуют в регуляции атрофического процесса и клеточного сигналинга при функциональной разгрузке мышц. Ингибирование как P2Y1, так и P2Y2 предотвращает накопление АТФ и регулирует интенсивность синтеза белка. Предотвращение атрофии m.soleus при вывешивании крыс с ингибированием рецепторов P2Y2 в большей степени связано с ингибированием катаболических процессов и влиянием на энергетический гомеостаз, чем с изменением анаболического сигналинга. Ингибирование рецепторов P2Y1 препятствует активации p38MAPK и замедляет экспрессию мРНК E3-лигазы MuRF1.

Впервые показано, что PI3K γ участвует в регуляции сигналинга при функциональной разгрузке m.soleus. Ингибирование PI3K при функциональной разгрузке предотвращает накопление АТФ и замедляет атрофию m.soleus путем снижения скорости элонгационных процессов и замедления экспрессии E3-убиквитинлигаз и убиквитина, а

также регулирует активность кальций-зависимых сигнальных путей при функциональной разгрузке мышц.

Впервые показано, что выход АТФ во внеклеточное пространство может являться запускающим сигналом для изменения экспрессии генов при функциональной разгрузке мышц. В передаче сигнала участвуют последовательно находящиеся в плазмолемме каналы Panx1, рецепторы P2Y1/2 и IP3K.

Теоретическая и практическая значимость

Исследование АТФ-зависимой сигнализации в скелетных мышцах при их функциональной разгрузке – фундаментальное направление в мышечной физиологии, которое может найти приложение в неврологии, экстремальной и реабилитационной медицине, геронтологии. Новые данные о работе ключевых сигнальных путей в скелетной мышце, подвергшейся атрофии, могут изменить традиционную парадигму о фармацевтических мишенях для её лечения при разгрузке, вызванной постельным режимом, космическим полётом или иммобилизацией. Результаты исследования можно будет использовать для разработки новых препаратов, ингибирующих работу паннексиновых каналов, P2Y и IP3 рецепторов при функциональной разгрузке мышц, для снижения степени атрофии или её предотвращения. Кроме того, полученные данные могут существенно расширить представление о фундаментальных механизмах развития атрофических процессов в мышце и позволят разработать подходы фармакологической коррекции негативных последствий гипокинезии и гравитационной разгрузки. Исследование работы Panx1-P2Y-IP3 пути позволит найти терапевтическую мишень для профилактики и лечения мышечной атрофии. По результатам работы зарегистрировано два патента: 1. “Способ предотвращения атрофии скелетных мышц при их функциональной разгрузке” №2797216; 2. “Способ предотвращения развития утомления скелетной мышцы” (рег. № 2023114128).

По актуальности поставленных задач, методическому и научному уровню исследований, их новизне и практической значимости, диссертационная работа Зариповой Ксении Асхатовны является законченной научно-квалификационной работой, которая отвечает п. 9 «Положение о порядке присуждения учёных степеней» (постановления правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемых к диссертацию на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

Личный вклад диссертанта состоит в планировании и проведении экспериментов, интерпретации и анализе полученных результатов, написании статей и подготовке докладов. При выполнении диссертационной работы автор проводил экспериментальную работу с животными, выделял белок и РНК, проводил исследование белков методом

Вестерн блоттинга, анализировал экспрессию генов методом ПЦР в реальном времени и оценивал содержание АТФ в мышце.

По теме диссертации опубликовано 19 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах из перечня ВАК РФ, а также включённых в Базы данных Scopus/ Web of science, 15 тезисов докладов.

Диссертационная работа Зариповой Ксении Асхатовны по специальности 3.7.7. Авиационная, космическая и морская медицина является научно-квалификационной работой, отвечающей на поставленные цели и задача. Положения, выносимые на защиту, сформулированы конкретно и научно обоснованы.

Диссертационная работа «АТФ-зависимая регуляция сигнальных путей в скелетных мышцах при моделируемой гравитационной разгрузке» Зариповой Ксении Асхатовны рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.7.7. Авиационная, космическая и морская медицина.

Заключение принято на заседании секции «Космическая физиология и биология» учёного совета ГНЦ РФ — ИМБП РАН. На заседании присутствовало 21 человек. Результаты голосования: «за» — 21 чел., «против» — нет, «воздержалось» — нет, Протокол N 14 от 22.11.2023.

Председатель секции

«Космическая физиология и биология»

Учёного совета ГНЦ РФ — ИМБП РАН., д.б.н.

В.Н. Сычёв

Учёный секретарь секции

«Космическая физиология и биология»

Учёного совета ГНЦ РФ — ИМБП РАН., д.б.н.

Л.Х. Пастушкова