

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

ведущего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем Российской академии наук доктора биологических наук Немировской Татьяны Леонидовны на диссертационную работу Исаевой Марии Олеговны на тему: «Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12», представленную в диссертационный совет 21.2.060.02 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность диссертационной работы

Янтарная кислота является промежуточным метаболитом в цикле Кребса, ключевом процессе клеточного дыхания, который обеспечивает организм энергией. Янтарная кислота может действовать как антиоксидант, нейтрализуя свободные радикалы, которые могут повреждать клетки и вызывать окислительный стресс. Это особенно важно в условиях интенсивных физических нагрузок, стресса и болезней, когда образуется больше свободных радикалов. Янтарная кислота, помимо своей роли в энергетическом обмене, все чаще признается сигнальной молекулой в организме. Самым важным механизмом сигнальной активности янтарной кислоты является её взаимодействие со специфическим рецептором сукцината 1 (SUCNR1). Этот рецептор локализуется на мембране различных клеток: мышцы, почки, сердце, иммунные, нервные и эндотелиальные клетки и другие. В последние годы наблюдается возрастающий интерес к изучению её влияния на процессы клеточной дифференцировки.

Клетки линии C2C12 являются широко распространенной моделью для изучения миогенной дифференцировки. Понимание механизмов действия

янтарной кислоты на дифференцировку C2C12 клеток позволит не только детализировать молекулярные пути, участвующие в этом процессе, но и внести значительный вклад в развитие теоретических основ регенерации тканей.

Научная новизна

Научная новизна диссертационной работы М.О. Исаевой заключается в комплексном исследовании механизмов воздействия янтарной кислоты на дифференцировку миогенных клеток линии C2C12, что позволило выявить клеточные и биохимические изменения, определяющие данную биологическую функцию. В работе впервые проанализирован механизм действия янтарной кислоты на индукцию миогенных маркеров, таких как MyoD и MyoG, а также специфических белков мышечной ткани - α -актин и тяжелых цепей миозина MYH. В ходе исследования выявлена и охарактеризована молекулярная мишень янтарной кислоты – рецептор сукцината 1, играющий роль в регуляции процесса дифференцировки мышечных миобластов C2C12. Установлено, что механизм воздействия янтарной кислоты на SUCNR1 реализуется посредством G α i-белка.

Впервые выявлено и доказано стимулирующее действие этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез клеточной линии C2C12, реализующиеся через SUCNR1 – G α i – сигнальный путь, предположительно за счет молекулы янтарной кислоты, входящей в его состав.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов, рекомендаций

Формирование исследования основывается на надлежащем дизайне, который соответствует современным требованиям. В работе проведено исчерпывающее количество экспериментов *in vitro*, в том числе со специфическим ингибитором SUCNR1 для установления типа G-белка через который оказывает свой эффект янтарная кислота. В работе использованы

современные и информативные биохимические методики: вестерн-блот, ВЭЖХ МС/МС. Визуализация клеток проводилась микроскопическим методом.

Полученные данные проанализированы с помощью таких программ как «Statsoft Statistica 13.0», Microsoft Excel 2016 и GraphPad Prism 10.

По итогам диссертационной работы сформулировано 5 выводов, которые соответствуют цели и задачам диссертационного исследования. Практические рекомендации являются обоснованными и подкрепленными результатами проведенной работы.

Теоретическая и практическая значимость

Янтарная кислота при дальнейшем исследовании может использоваться как биостимулятор в медицинской практике, в частности для восстановления мышечной ткани при травмах, атрофиях или других патологиях. Изучение механизмов её действия позволит оптимизировать подходы к применению янтарной кислоты в клинической практике, а также разрабатывать новые лекарства на основе её производных.

Данное исследование способствует развитию научных знаний в области биохимии, клеточной биологии, регенеративной медицины и фармакологии, тем самым создавая прочную основу для дальнейших исследований и практического применения янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината в клинической практике.

Содержание работы, ее оформление и завершенность

Диссертация Исаевой М.О. является полностью завершенным исследованием, выполненным в соответствии с классическим планом, содержит 72 рисунка и 18 таблиц, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки

темы, списка сокращений и списка литературы. В списке литературы приведено 199 источников.

Во введении автором достаточно полно и лаконично описано актуальность темы, определены цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования. Положения, выносимые на защиту четко отражают суть полученных результатов и достижения цели диссертации.

В главе «Обзор литературы» автор грамотно и квалифицированно представляет известные на данный момент сведения о клеточных линиях, используемых для изучения структурно-функциональных особенностей скелетной мышечной ткани, миогенезе, его регуляции с помощью транскрипционных факторов, сигнальных путей, экзогенных веществ, описана роль янтарной кислоты как метаболита энергетических процессов, так и сигнальной молекулы, приведены лекарственные препараты содержащие в своем составе сукцинат, проанализированы литературные данные о строении, функционировании сукцинатного рецептора (SUCNR1) и его ингибитора (Pertussis toxin).

Глава «Материалы и методы исследования» дает достаточно полное представление о используемой клеточной линии C2C12, дизайне исследования и сериях экспериментальных групп. Используемые диссертантом методы адекватны целям и задачам работы и позволяют осуществить комплексную оценку миогенеза мышечных миобластов C2C12. Объем и современность используемых методов позволили обеспечить высокий научно-методический уровень диссертации. Методы статистической обработки результатов исследования адекватны.

В главе «Результаты исследования» приведены качественные рисунки клеток линии C2C12 с окрашиванием по Романовскому-Гимзе, таблицы с данными статистических исследований. Результаты экспериментов соответствуют цели работы и сгруппированы в соответствии с задачами. В конце каждого подпункта резюмируются полученные данные исследований.

В ходе проведенных Исаевой М.О. исследований было установлено, что янтарная кислота в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ стимулирует миогенную дифференцировку клеток линии C2C12, что доказывает морфологические изменения, возрастание индекса миогенеза и увеличение относительного количества миогенных регуляторных факторов (MyoD, MyoG) и маркерных белков (α -актин, MYH).

В ходе настоящего исследования было выявлено, что янтарная кислота не влияет на относительное количество транскрипционных факторов NF- κ B и PXR, следовательно данные факторы не участвуют в стимуляции миогенеза тестируемым веществом. Установлено, что уровень SUCNR1 снижается, как в процессе миогенеза, так и при воздействии янтарной кислоты, что говорит о его вовлеченности в регуляцию данного процесса тестируемым веществом.

Выявлено, что этилметилгидроксипиридина сукцинат – лекарственное средство, содержащее в своём составе янтарную кислоту обладает аналогичным стимулирующим действием на миогенез клеточной линии C2C12, что собственно янтарная кислота.

Использование в работе ингибитора SUCNR1-Gai сигнального пути - Pertussis toxin показало подавление стимулирующего действия на миогенез янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината. Дополнительная оценка внутриклеточной концентрации инозитолмонофосфата продемонстрировала увеличение уровня данного метаболита при воздействии янтарной кислоты, внесение в питательную среду Pertussis toxin препятствовало нарастанию.

На основе полученных результатов автор заключает, что стимуляция миогенеза янтарной кислотой и этилметилгидроксипиридина сукцинатом осуществляется через SUCNR1-Gai – сигнальный путь.

В главе «Обсуждение результатов» автор критически анализирует результаты исследования, сопоставляя их с литературными данными. «Заключение» содержит краткое обобщение результатов работы.

Выводы Исаевой М.О. четко сформулированы и обоснованы, логически вытекают из результатов исследования и соответствуют задачам.

Замечания по диссертации

Принципиальных замечаний к стилю изложения и к оформлению диссертации нет. В диссертации встречаются единичные орфографические и стилистические опечатки, которые не влияют на общую положительную оценку работы.

В процессе ознакомления с работой возникли некоторые вопросы:

1. Почему оценивали уровень PXR и NIF-1a? Как данные факторы связаны с миогенезом?
2. Происходит ли повышение уровня внутриклеточного инозитолмонофосфата при воздействии этилметилгидроксипиридина сукцината?
3. Почему при проверке гипотезы запуска миогенной дифференцировки клеток C2C12 при добавлении янтарной кислоты в недифференцировочную питательную среду использовали концентрацию тестируемого вещества 100 мкМ?

Заключение

Диссертационная работа Исаевой Марии Олеговны «Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12» является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи связанной с оценкой влияния янтарной кислоты и роли сукцинатных рецепторов в миогенезе клеточной линии C2C12.

По объему и достоверности полученных результатов, актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертация Исаевой Марии Олеговны полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор

заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук (03.00.13 - Физиология,
03.00.25 - Гистология, цитология, клеточная биология),
ведущий научный сотрудник Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр
Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук



Немировская Т.Л.

Подпись д.б.н. Немировской Т.Л. заверяю:
Ученый секретарь ЦЕНТРА ИМБП РАН, д.б.н.



Левинских М. А.

05.02.2015
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-
биологических проблем Российской академии наук
123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д.76, стр. А
Тел.: +7 (499) 195-2363, +7 (499) 195-1573
E-mail: doc@imbp.ru

