

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора Брындиной Ирины Георгиевны 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 темы исследования

Скелетная мускулатура, составляющая около 40% массы тела играет важную роль не только в двигательной активности и поддержании позы, но и в регуляции функций организма путем выработки биологически активных веществ (миокинов), влияющих на метаболизм жиров, углеводов и липидов, в терморегуляции. Поддержание высокой работоспособности и выносливости скелетных мышц является важной задачей превентивной и клинической медицины, которая располагает определенным набором средств, как медикаментозных, так и немедикаментозных, включающих, в том числе, вещества, способные оптимизировать метаболические процессы и энергетику клеток. К таким веществам относится и янтарная кислота (сукцинат) - метаболит, участвующий в энергетическом обмене и оказывающий влияние на метаболические процессы в мышечных клетках. Однако не все известные к настоящему времени эффекты сукцината могут быть объяснены с точки зрения биохимии и физиологии процессов, происходящих в скелетной мышце. Так, малоизученной является её роль в дифференцировке миобластов, для которой необходима активация определенных сигнальных белков. Поэтому исследование Исаевой Марии Олеговны является актуальным и способно пролить свет на ряд малоизученных механизмов влияния метаболически активных веществ на процессы развития клеточных элементов мышечной ткани.

Известно, что исследования биохимических и функциональных свойств мышечной ткани нередко проводятся *in vitro*, с использованием классических модельных систем, в частности мышиной клеточной линии C2C12 - миобластов, способных к спонтанной дифференцировке в миотубулы при определенных условиях, таких как изменение среды культивирования. Эта

способность делает данные клетки удобной моделью для изучения механизмов, регулирующих процесс миогенеза, что и было использовано автором в диссертационной работе.

Анализ решенных задач

Автором в ходе выполнения диссертационного исследования была сформулирована цель – изучить механизмы действия янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12 и определить роль сукцинатных рецепторов (SUCNR1) в данном процессе.

Для реализации поставленной цели было поставлено несколько задач: оценить влияние экзогенной янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12, проанализировать влияние лекарственного средства, содержащего янтарную кислоту – этилметилгидроксипиридина сукцината (ЭМГПС), на процесс дифференцировки клеток линии C2C12, изучить участие SUCNR1, HIF-1 α и PXR в процессе дифференцировки клеток линии C2C12 под действием янтарной кислоты и ЭМГПС, оценить внутриклеточную концентрацию сукцината при экзогенном воздействии янтарной кислоты, а также выявить роль SUCNR1 и сопряженного G α i-белка в эффектах янтарной кислоты и ЭМГПС на миообласты.

Успешное выполнение задач, поставленных соискателем в ходе диссертационной работы, позволило достичь целей исследования и сформулировать корректные выводы.

Анализ научной новизны и достоверности результатов исследования

В рамках диссертационного исследования М.О. Исаевой впервые было установлено, что янтарная кислота влияет на процесс миогенеза клеточной линии C2C12, при этом механизм её воздействия ассоциирован с SUCNR1 и G α i-белком. Показано, что стимулирующее действие ЭМГПС на миогенез клеточной линии C2C12 также предположительно реализуется через SUCNR1 – G α i – сигнальный путь. Также установлено, что HIF-1 α и PXR не принимают участия в процессе миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты.

Надежность и достоверность результатов диссертационной работы гарантированы выполнением необходимого объема исследований и использованием соответствующих корректных методов статистической обработки данных, что обеспечивает правильную интерпретацию полученных результатов.

Анализ теоретической и практической значимости

Полученные автором данные расширяют современные представления о механизмах регуляции клеточной дифференцировки и регенерации. Результаты работы будут полезны для дальнейших фундаментальных исследований в области биохимии и клеточной биологии. С учетом уникальных свойств янтарной кислоты, изучение ее роли в миогенной дифференцировке может служить теоретической базой для объяснения ее позитивных эффектов и применения в регенеративной медицине, включая создание новых медикаментозных и немедикаментозных подходов, которые в перспективе могут быть применены в лечебной, профилактической и реабилитационной практике.

Автором изучен новый эффект ЭМГПС, что при дальнейшем исследовании может позволить использовать препарат для стимуляции регенерации скелетных мышц после травм.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России и кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, а также в научно-исследовательскую деятельность ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Объем и структура работы

Диссертационная работа включает в себя регламентированные ГОСТ 7.0.11-2011 основные структурные элементы и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы.

Во введении дано обоснование актуальности темы, указаны степень разработанности проблемы, цель и задачи, научная новизна, теоретическая и

практическая значимость работы, описана методология и методы исследования, изложены основные положения, выносимые на защиту.

В разделе «Обзор литературы» представлены актуальные научные данные по теме исследования, проведен их критический анализ, а также выявлены спорные и недостаточно изученные вопросы.

Далее изложены материалы и методы, применяемые в исследовании. Работа была выполнена *in vitro* на клетках линии C2C12. Эксперимент состоял из нескольких этапов: изучение механизма миогенеза при воздействии янтарной кислоты и ЭМГПС, выявление возможных механизмов индукции дифференцировки под действием данных веществ, определение типа G-белка, через который янтарная кислота и ЭМГПС оказывают влияние на миогенез. Раздел иллюстрирован схемами и таблицами. Работа выполнена с применением современных высокоинформативных биохимических методов, позволяющих полностью решить поставленные задачи. Протоколы написаны детально с уточнением всех условий проведения экспериментов.

Глава 3 содержит результаты исследования, которые систематизированы в соответствии целью и поставленными задачами. Проведена оценка возможного цитотоксического действия препаратов. Графики и таблицы наглядно демонстрируют полученные автором результаты, обеспечивая полное понимание проделанной работы.

В ходе исследования было показано, что янтарная кислота в концентрациях 10, 100, 1000 мкМ стимулирует и ускоряет процесс миогенной дифференцировки клеток линии C2C12 через активацию SUCNR1-Gi α -сигнального пути, происходит индукция миогенных регуляторных факторов MyoD, MyoG и специфических белков мышечной ткани α -актина и тяжелых цепей миозина (MYH). Аналогичный эффект на миогенез проявляет препарат, содержащий сукцинат – ЭМГПС.

С помощью разработанной и валидированной методики ВЭЖХ МС/МС было установлено, концентрация внутриклеточного сукцината снижается в процессе миогенной дифференцировки, так и при внесении экзогенной янтарной кислоты. К увеличению уровня внутриклеточного инозитолмонофосфата приводило добавление янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ в дифференцировочную среду, а внесение ее

совместно с коклюшным токсином не влияло на уровень исследуемого метаболита.

Полученные результаты работы изложены грамотно, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, результаты подвергнуты детальному анализу и обсуждению, выводы обоснованы и полностью базируются на полученных данных.

Подтверждение полученных результатов диссертации в научных изданиях

Материалы диссертационного исследования отражены в 14 публикациях, которые полностью раскрывают содержание выполненной работы и его основные результаты. Среди публикаций автора 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе в 3 журналах, входящих в базу данных Scopus. По результатам работы оформлены 2 патента на изобретения, зарегистрированные в РФ.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Автореферат точно и полно отражает содержание и ключевые выводы диссертации, при этом оформленный в соответствии с современными стандартами.

Замечания по диссертации

Принципиальных замечаний по работе нет.

Вопросы, возникшие при анализе работы:

1. Известно, что ЭМГПС является препаратом, достаточно широко используемым в клинической практике. Какие из его известных механизмов действия теоретически могли бы способствовать тем эффектам, которые изучены автором?
2. Могут ли отличаться эффекты сукцината на процесс дифференцировки миобластов в условиях его внеклеточного действия на рецепторы и при внутриклеточном повышении его концентрации?

Заключение

Диссертация Исаевой Марии Олеговны «Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии С2С12», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научно-квалификационной работой, содержит решение научной задачи изучение механизмов влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии С2С12 и оценка роли сукцинатных рецепторов в данном процессе.

По объему, степени достоверности результатов исследования, научной новизне, изложению и оформлению диссертация в полной мере соответствует пункту 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, Исаева Мария Олеговна, заслуживает присуждения степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

заведующий кафедрой патологической физиологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук (03.00.13 - Физиология), профессор



Брындина И.Г.

Подпись д.м.н., профессора И.Г. Брындиной, заверяю:

Ученый секретарь ученого Совета
ФГБОУ ВО ИГМА Минздрава России

д.м.н., доцент

04.02.2015



Лукина С.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации
426034, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д.281
Тел.: +7 (3412) 52-62-01, +7 (3412) 65-82-68
E-mail: ur@igma.udm.ru