

УТВЕРЖДАЮ



И.о. директора ИТЭБ РАН
д.ф.-м.н. Дуев Геннадий Николаевич

«14» февраля 2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук

на диссертационную работу **Исаевой Марии Олеговны** «Механизмы влияния
янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12», представленную
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук
по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

Проблемы регенерации скелетной мышечной ткани тесно связаны с миогенезом, включающим стадии пролиферации, дифференцировки и формирования микротрубочек с созреванием в миоволокна. Эти процессы в миобластах контролируются рядом таких последовательно экспрессируемых факторов, как MRE, MyoD, MRF4, MyoG, а также миосателлитами (фактор Myf5). Важную роль в ремоделировании мышц в ответ на физическую нагрузку выполняют внутриклеточные и внеклеточные метаболиты, среди которых важную роль играет янтарная кислота. Она обладает как минимум четырьмя функциями: энергетически эффективного субстрата окисления в митохондриях, модификатора белков посредством сукцинилирования, цитозольного стабилизатора и инициатора транскрипционных факторов, в частности HIF-1 α , лиганда стрессового рецептора SUCNR1. Причем сукцинатному рецептору SUCNR1 принадлежит значимая роль в процессе ремоделирования мышц.

Полифункциональная активность янтарной кислоты и сукцинат-содержащих средств издавна привлекает внимание фармакологов и множества исследователей в области восстановительной миологии. Однако сколько-нибудь полного представления о сходном механизме влияния этих агентов на миогенез до сих пор нет. Не в последнюю очередь эта неполнота знаний обусловлена структурно-функциональной сложностью миогенеза и ремоделирования скелетных мышц *in vivo*. Поэтому автор работы вполне оправдано выбрала для решения столь сложной задачи культивируемые клетки линии C2C12 - вполне адекватную модель *in vitro* для изучения механизма воздействия на миогенез янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридин сукцината (ЭМГПС), содержащего до 46 % янтарной кислоты. Клетки C2C12 часто используется в биомедицинских исследованиях для изучения метаболизма и дифференцировки скелетных мышц. Важно, что культура C2C12 *in vitro* может воспроизводить в значительной мере

основные этапы миогенеза. Они хорошо подходят для изучения механизма действия на миогенез экзогенной янтарной кислоты и ЭМГПС, которые известны в настоящее время как средства, используемые не только при физиологических и экстремальных мышечных нагрузках в восстановительной медицине, но и при врожденных и приобретенных миопатиях. Изучение механизма действия янтарной кислоты на миогенез в связи с этим является остро актуальной проблемой, решение которой может выявить ряд фундаментальных механизмов контроля миогенеза и открыть новые фармакологические перспективы для коррекции процессов ремоделирования, а также в профилактике и лечении мышечной патологии.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Исаевой Марии Олеговны изложена на 165 страницах, содержит 18 таблиц и 72 рисунка. Диссертация имеет классическую структуру и включает все необходимые разделы: «Введение», четыре главы («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследований» «Обсуждение результатов»), «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Перспективы дальнейших разработок темы», «Список сокращений»; «Список литературы». Список литературы обширен и содержит 199 источников, из них 25 отечественных и 174 зарубежных.

Во «**Введении**» на уровне современных знаний представлена актуальность исследования по миогенезу как сложному этапному процессу эмбрионального и постэмбрионального образования мышечной ткани, а также главному механизму ремоделирования мышечной ткани, включающему в себя стадии пролиферации, дифференцировки и формирования миотрубочек с созреванием в миофибриллы. Указано, что одним из главных факторов, участвующих в развитии и восстановлении мышечной ткани, является семейство миогенных регуляторных факторов, изучение динамики которых и стало основным предметом диссертационного исследования.

В связи с тем, что в ряде работ демонстрируется участие янтарной кислоты в регуляции ремоделирования мышц в ответ на физическую нагрузку и участие сукцинатного рецептора в этом процессе, автор привлекает внимание к особой роли янтарной кислоты как интермедиата цикла Кребса, который играет важную роль не только в энергопродукции митохондрий, но и за пределами митохондриального энергетического обмена. Приведены данные современных исследований по механизмам действия внемитохондриальной и внеклеточной янтарной кислоты. Её важнейший цитозольный акцептор – транскрипционный фактор HIF-1 α – является сенсором кислородного обеспечения, выполняющим при стабилизации функции эпигенетического модулятора экспрессии генов адаптации к гипоксии. Особое внимание уделено лигандной роли внеклеточной янтарной кислоты в отношении наружного клеточного G-рецептора SUCNR1, который экспрессируется в почках, печени, сердце, клетках сетчатки и иммунной системы, а также в множестве других тканей.

На основании анализа состояния проблемы регуляции миогенеза и современных представлений об эффектах и возможных механизмах действия янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридин сукцината сформулирована цель исследования как необходимость изучить «механизмы действия янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12 и определить роль сукцинатных рецепторов

(SUCNR1) в данном процессе». Для достижения цели поставлено пять логически связанных задач. В результате выполнения этих задач автор приходит к заключению, сформулировав пять полностью обоснованных положений, выносимых на защиту, и пять выводов, соответствующих поставленным задачам.

Глава «Обзор литературы» начинается с информирования читателя о том, что включает в себя понятие миогенез. Описываются его этапы, маркеры, регуляторные факторы. Выделяется участие транскрипционных факторов в регуляции миогенеза, дается общая подробная характеристика сигнальных путей, участвующих в контроле миогенеза.

Отдельные разделы посвящены анализу того, какие клеточные линии используются для изучения структурно-функциональных особенностей скелетной мышечной ткани. Из приведенного обзора ясно, почему автор избрала для исследований клеточную линию C2C12, выделенную из мышечных клеток мышей. Дело в том, что клеточная линия C2C12 удобна для изучения фундаментальных процессов мышечной ткани благодаря простоте культивирования и способности к дифференцировке. При этом автор понимает возможные ограничения работы с клетками C2C12.

Далее следует, на мой взгляд, не совсем оправданное нарушение логики изложения материала. Первоначально автор описывает сукцинатный рецептор, его структуру, локализацию в клеточной мембране, функции, действие в различных клетках и органах, механизм функционирования через G-белки. И лишь затем представляет роль метаболитов, в частности, янтарной кислоты и сукцинат-содержащих средств. Мне кажется, было бы логичнее сначала представить данные о роли и об известных эффектах янтарной кислоты, а затем обосновать, почему автор сосредоточился на сукцинатном рецепторе, а не на других механизмах действия янтарной кислоты. Такого обоснования явно не хватает. Хотя для восприятия обзора авторская последовательность изложения литературного материала влияет не существенно.

В связи с изучением вовлеченности сукцинатного рецептора в механизм действия янтарной кислоты автор приводит далеко не всем известную информацию о коклюшном токсине (pertussis toxin) как удобном инструменте для изучения передачи сигналов через гетеродимерные G-белки.

Хорошее впечатление оставляет анализ участия клеточных метаболитов, биологически активных веществ, лекарственных препаратов и интермедиатов обменных процессов в регуляции миогенеза. При этом, учитывая выбор объекта исследования, автор приводит подробную таблицу о влиянии различных лекарственных препаратов и биологически активных веществ на клетки C2C12.

В обзоре представлены интересные сведения о PXR, который функционирует как сенсор чужеродных соединений, обнаруживая их присутствие и инициируя ответный метаболический путь для элиминации ксенобиотиков из организма. Однако, как покажет далее автор, янтарная кислота не активирует PXR, что вполне естественно, так как она не является чужеродным соединением.

Кончается обзор перечнем современных представлений о возможных механизмах действия янтарной кислоты на мышечную ткань, которые в настоящее время активно исследуются и до сих пор детально не изучены. При этом автор фокусируется на механизме, каким может быть взаимодействие с сукцинатным рецептором. Важно, что это взаимодействие можно полноценно изучить на культуре клеток C2C12.

Привлекает в обзоре то, что диссертант понимает разницу между возможными механизмами действий эндогенной и экзогенной янтарной кислоты, и о важности длительности и величины сукцинатного «импульса действия». В отличие от диссертанта, большинство исследователей, описывая и изучая эффекты янтарной кислоты, не осознают эти по сути ключевые различия.

Остановлюсь на некоторых недочетах литературного обзора. Так, Исаева М.О. принимает за аналог янтарной кислоты диметилсукцинат. Это одно из сотен соединений, в которых сукцинильный радикал связан химически с иной молекулярной группой. В лучшем случае, такое вещество можно назвать производным, но не аналогом янтарной кислоты. Не стоит брать за пример еще большую ошибку такого же рода, совершенную авторами реамберина, сводя механизмы действия меглюмината натрия сукцината к эффектам янтарной кислоты. На мой взгляд, спорно рассматривать действие препарата этилметилгидроксипиридина сукцината только с позиций анализа эффектов янтарной кислоты, которая в препарате даже не связана химически. Судя по справочным данным баз Видаля и РЛС, это смесь двух веществ. Едва ли корректно не учитывать действие другой составной части препарата, представленной этилметилгидроксипиридином, который может обладать широким спектром активности, подобной витамину В6. Сводить действие препарата к эффектам сукцината – большое упрощение, судя по данным автора диссертации, приведенным в главе Результаты.

В целом обзор является высококвалифицированным самостоятельным исследованием. Его можно использовать как учебное руководство, благодаря энциклопедичности и ясности представления материала. Несомненно, представленная обзорная информация будет полезна не только для магистрантов и аспирантов, но и для многих медицинских специалистов, фармакологов и научных сотрудников.

«**Материалы и методы исследования**», так же, как и дизайн постановки серии экспериментов на клетках линии С2С12, заслуживают самой высокой оценки. Автор досконально описывает все экспериментальные процедуры, начиная с процесса культивирования клеток.

Использованные методы исследования современны и адекватны поставленным задачам, свидетельствуют о высокой квалификации автора.

Выбранные автором концентрации янтарной кислоты в диапазоне 1, 10, 100 и 1000 мкМ, соответствуют тем, которые встречаются при разных физиологических состояниях у человека и животных. Несколько смущает, что автор при работе с этилметилгидроксипиридином сукцината использует практически такие же концентрации 10, 100 и 1000 мкМ. Дело в том, что этот препарат содержит не более 46,5% янтарной кислоты, что следовало бы пояснить.

Механизм действия янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината через SUKNR1 оценивали с помощью экспериментов с ингибитором SUKNR1 в параллельных экспериментах ± коклюшный токсин. Индекс миогенеза и его изменения при добавлении янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината определяли микроскопически. Цитотоксичность янтарной кислоты, этилметилгидроксипиридина сукцината, в том числе в присутствии коклюшного токсина, оценивали по результатам МТТ-теста.

Концентрацию сукцината внутри клетки определяли методом ВЭЖХ МС/МС. Относительное количество транскрипционных факторов, сукцинатного рецептора

SUKNR1 и мышечных специфических белков оценивали методом вестерн-блот. Активность SUKNR1 определяли по концентрации инозитол-3-фосфата в цитоплазме клеток методом ВЭЖХ МС/МС.

Полученные результаты обработаны адекватными методами статистики. Из приведенных описаний, однако, далеко не всегда ясно, относительно чего рассчитывалось относительное количество измеряемых белковых и прочих факторов.

В главе «**Результаты**» даны чёткие пояснения по всем полученным данным. Результаты подробно описаны и проиллюстрированы рисунками и таблицами. Представлены пятнадцать полноценных разделов и подразделов, в которых автор последовательно решает поставленные задачи. Первый раздел посвящен анализу этапов дифференцировки клеточной линии C2C12. Второй раздел представляет исследования действия янтарной кислоты на этапы миогенеза и включает 4 подраздела, в том числе по оценке цитотоксичности, изменению морфологии клеток, индекса миогенеза, относительного количества транскрипционных факторов и специфических белков и, наконец, по механизмам возможного действия янтарной кислоты на миогенез. Третий и четвертый раздел практически в такой же последовательности, как второй, рассматривает эффекты ЭМГПС, янтарной кислоты и коклюшного токсина. Пятый раздел представляет важный фрагмент по влиянию экзогенной янтарной кислоты на концентрацию внутриклеточного сукцината на этапах миогенной дифференцировки. Назвав внутриклеточный сукцинат в присутствии экзогенного сукцината эндогенным, автор явно не учитывает результаты известных работ по фармакокинетике и превращениям меченного экзогенного сукцината.

Весьма показательно действие коклюшного токсина, блокирующего эффект активации сукцинатного рецептора: полностью ликвидируется подъем концентрации инозитолмонофосфата в клетках C2C12 даже в присутствии 100 мкМ янтарной кислоты. Это является ключевым доказательством вовлечения в реализацию эффектов янтарной кислоты на миогенез сукцинатного рецептора.

Замечательно написан раздела «**Обсуждение результатов**». На хорошем уровне представлен интегральный и подробный анализ, грамотно интерпретированы практически все полученные результаты. В завершении раздела составлена корректная схема, иллюстрирующая и обобщающая представления диссертанта об исследованных механизмах действия экзогенной янтарной кислоты.

Закключение выглядит доказательно, представляет квинтэссенцию полученных результатов: экзогенная янтарная кислота ускоряет дифференцировку миобластов за счет повышения уровня основных регуляторных факторов и прироста белков мышечной ткани в значительной мере посредством лигандного воздействия на сукцинатный рецептор SYCNR1. Во многом аналогичное влияние на миогенез оказывает сукцинат-содержащий препарат ЭМГПС.

Выводы работы, как уже указывалось выше, отражают доказательное решение поставленных задач и дают основания считать исследование законченным, открывающим большие перспективы для последующего изучения и создания новых лекарственных средств, в частности включающих янтарную кислоту.

Автореферат диссертации оформлен по стандартной форме, соответствует установленным требованиям, хорошо иллюстрирован фотографиями, таблицами и

схемами, даёт полное представление о содержании диссертации, обоснованности положений, вынесенных на защиту, новизне исследования и степени личного участия автора в представленной работе

Личный вклад Исаевой М.О. составляет не менее 90%: самостоятельно составлен обзор и проведен анализ актуальной литературы по рассматриваемой проблеме; разработана программа исследования; выполнены эксперименты на клетках и биохимические исследования, обработаны и интерпретированы полученные данные; подготовлены 14 публикаций, в том числе 4 статьи в журналах из перечня ВАК при Минобрнауки РФ, включая 3 публикации в журналах, входящих в базу Scopus; получено 2 патента РФ на изобретения.

Ключевые результаты диссертационной работы **внедрены автором в практику**: интегрированы и используются в учебном процессе на кафедрах биохимии, гистологии, цитологии и эмбриологии ВУЗов, а также в научно-исследовательской деятельности ЦНИЛ Рязанского ГМУ Минздрава России.

Новизна полученных результатов и выводов вполне убедительна. Впервые показана роль янтарной кислоты в миогенезе на клетках C2C12 *in vitro*, проявляющаяся во влиянии на уровень специфических белков мышечной ткани и транскрипционных факторов, индекс миогенеза; изменение количества рецепторов SUCNR1 и превращение миобластов в миотубулы. Установлена вовлеченность Gαi-белка в механизме воздействия на SUCNR1 при отсутствии участия HIF-1α и PXR в процессе миогенной дифференцировки клеток C2C12 при действии экзогенной янтарной кислоты. Доказано стимулирующее действие этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез через SUCNR1– Gαi – сигнальный путь, предположительно за счет янтарной кислоты как компонента препарата.

Научно-практическое значение работы можно оценить как важный вклад в понимание биохимических и физиологических процессов при воздействии экзогенной янтарной кислоты на миогенез, вскрытие ряда молекулярных механизмов влияния на функциональное состояние мышечной ткани по крайней мере *in vitro*, в том числе на процессы регенерации, роста и восстановления. Практическая значимость полученных современных данных о механизме действия экзогенной янтарной кислоты и этилметилгидроксипиридина сукцината выходит далеко за рамки рецензируемого исследования. Хотелось бы особенно подчеркнуть их в следующем разделе отзыва.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации. Работа Исаевой М.О. оформлена в соответствии с ГОСТ 7.0.11-2011, написана ясным научным языком, легко и с интересом читается.

Достоинства работы как большого труда, вносящего весомый вклад в биохимию и физиологию миогенеза, несомненны. Представленная диссертационная работа является не просто высококачественным и завершённым в рамках поставленных задач исследованием, но и открывает новые перспективы для продолжения теоретически и практически важных исследований. Автор понимает это, посвятив перспективам исследований отдельный раздел диссертации. Исаева М.О. с вескими основаниями пишет о том, что «изучение в клинической практике позволит использовать этилметилгидроксипиридин сукцинат для реабилитационных программ, направленных на восстановление двигательной активности

и мышечной силы у пациентов с неврологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями».

Весьма значимы результаты, демонстрирующие возможности использования клеточной линии C2C12 в качестве экспериментальной модели мышечных патологий, позволяющей рассматривать рецептор SUCNR1 как терапевтическую мишень для действия экзогенной янтарной кислоты, в частности при стимуляции миогенеза. Заслуживает внимания стремление автора использовать полученные данные «для создания новых препаратов и методов лечения заболеваний, связанных с нарушениями функций мышечной ткани, таких как миопатии, саркопения, а также при реабилитации после травм». Однако хотелось бы видеть более взвешенную экстраполяцию безусловно важных результатов, полученных *in vitro*, на уровень целого организма.

Вполне обоснованы и предложения диссертанта о возможной интеграции янтарная кислота в программы спортивного питания и восстановления, для улучшения результатов тренировок, ускорения восстановления мышц после нагрузок и повышения общей спортивной продуктивности. Казалось бы, эти предложения смотрятся запоздало после работ Н.Р. Чаговец, А.С. Розенфельда, Ю.Г. Каминского и наших исследований по поводу практического применения препаратов янтарной кислоты в спорте и при иных экстремальных нагрузках, реализованных еще на Олимпийских играх 1976 и 1980 годов, тем более, после рекомендаций Спорткомитета 2005 года. Однако, если мы обратимся к современным требованиям, предъявляемым к фармакологическим средствам, то следует признать, что именно работа Исаевой М.О. дает необходимый стимул, право на использование экзогенной янтарной кислоты, будучи источником актуальных научно обоснованных аргументов о современных представлениях относительно механизмов фармакологического контроля миогенеза и действия сукцинат-содержащих препаратов.

Выполненное исследование раскрывает важную составляющую механизма действия этилметилгидроксипиридина сукцината, который уже применяется «для лечения заболеваний, связанных с неврологическими и сердечно-сосудистыми патологиями, как стимулятора миогенеза». Результаты работы Исаевой М.О. способствуют существенному расширению показаний для использования ЭМГПС в терапии мышечных заболеваний, таких как мышечные дистрофии, миозиты, травмы и возрастная атрофия мышц.

Не могу не заметить, что автор напрасно не включила в текст диссертации работы раздел с перечнем собственных публикаций. К сожалению, некоторые упомянутые в тексте автореферата литературные источники не включены в список литературы, и соответственно нет ссылок на основополагающие российские обзоры и экспериментальные исследования, посвященные эффектам и возможным механизмам действия экзогенной янтарной кислоты, в частности, нет работ Л.Д. Лукьяновой, Санкт-Петербургской и Пущинской научных школ.

Однако нет принципиальных замечаний, которые могли бы хоть в какой-то мере позволить усомниться в доказательности и значимости представленных результатов и выводов. Отдельные замечания и вопросы, высказанные выше, не влияют на высокую оценку исследования Исаевой М.О.

Заключение.

Диссертационная работа Исаевой Марии Олеговны «Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии C2C12» представляет собой

актуальное, грамотно спланированное и проведённое на высоком методологическом и методическом уровне научное исследование, имеющее как фундаментальное, так и важное прикладное значение. Работа отвечает всем требованиям пп. 9-14, установленным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842 «О порядке присуждения учёных степеней» (в ред. от 25.01.2024), а её автор, Исаева Мария Олеговна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертационная работа была обсуждена, а отзыв на неё был заслушан и утверждён на научном семинаре секции Учёного совета ИТЭБ РАН «Биомедицина» 29 января 2025 года (протокол № 2).

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией энергетики биологических систем ИТЭБ РАН,
профессор, доктор медицинских наук

Маевский Евгений Ильич

07.02.2025

eim11@mail.ru



Подпись: *Маевский Е. И.*
ДОСТОПЕРЯЮ-ЗАВ. ОДОУ
О. В. СЕНОТОВА
О. В. С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук
Адрес: 142290, г.Пушино, Московской обл., ул. Институтская, 3
Телефон: 8 (495) 632-78-69, e-mail: eim11@mail.ru