

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Тыганова Сергея Александровича «Реализация механического сигнала в скелетной мышце млекопитающих на фоне гравитационной разгрузки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология»

Хорошо известно, что механические воздействия абсолютно необходимы для мышечной ткани. Без них наступает атрофия мышц, уменьшение их объема и снижение силовых характеристик. Такие состояния возникают у обездвиженных по разным причинам больных, а также у здоровых людей, пребывающих в условиях невесомости, главным образом, у космонавтов. Разработаны методы восстановления мышечной массы и активности путем подачи механических и электрических стимулов на мышцы и путем имитации работы проприорецепторов опорных зон. Значительно меньше развита фармакологическая составляющая мышечного восстановления. Это связано с недостаточным пониманием молекулярных аспектов передачи механических сигналов к мышечным волокнам и сигнальных процессов, запускаемых механическими воздействиями в самих мышечных волокнах. Диссертационная работа С.А. Тыганова посвящена этой актуальной проблеме и ставит своей целью изучение механизмов реализации механического сигнала в системе регуляции синтеза белка в скелетной мышце млекопитающих на фоне гравитационной разгрузки.

В работе сформулированы следующие группы экспериментальных задач:

1. Провести анализ сигнальных путей, ответственных за анаболические процессы в постуральной мышце крысы (камбаловидной мышце) на разных сроках гравитационной разгрузки задних конечностей животного и последующей стандартизированной нагрузки мышцы *ex vivo*.
2. Оценить вклад механочувствительных каналов в реализацию механического сигнала при эксцентрическом сокращении мышцы *ex vivo* после гравитационной разгрузки.
3. Изучить роль опорной афферентации в поддержании стабильности анаболических процессов в постуральной мышце млекопитающих на фоне гравитационной разгрузки и последующей механостимуляции.

В работе применены следующие методы и подходы.

Работа выполнена на крысах линии Wistar. Для создания гравитационной разгрузки использовали известную и широко употребляемую в мире методику Ильина-Новикова в

ИМБЛ
Вход. № 08/1335
от 11.06.2019

модификации Морей-Холтон. Механическую стимуляцию стопы у крыс проводили с помощью пневматически активируемой платформы. Растяжение и измерение сокращения изолированного мышечного волокна выполняли в физиологической установке «organ-bath», совмещенной с электростимулятором и динамометром. В работе использованы современные аналитические методы: гель-электрофорез и иммуоблоттинг. Благодаря широкому спектру коммерчески доступных антител, в том числе, фосфоспецифических антител к маркерным белкам диссертант смог изучить процессы внутриклеточной анаболической сигнализации в камбаловидной мышце. Для оценки уровня белкового синтеза был использован метод SUnSET, предложенный Goodman et al. в 2011 году. Все примененные методические подходы адекватны поставленным задачам и позволяют получать достоверные результаты.

При выполнении работы автор получил следующие основные результаты.

1. Снижение синтеза белка в камбаловидной мышце после 3 и 7 дней гравитационной разгрузки сопровождается снижением фосфорилирования и инактивацией ряда анаболических молекулярных маркеров, таких как белок 4E-BP1 и протеинкиназа p90RSK. При этом, неожиданно, активность основной мишени mTORC1 рибосомальной киназы p70S6K1 остается повышенной. Наблюдается дефосфорилирование протеинкиназы GSK-3 β , что приводит к повышению ее активности.
2. После функциональной разгрузки мышц эффективность их восстановления с помощью эксцентрических сокращений падает из-за снижения ответа сигнального пути Akt/mTORC1/p70s6k. Это в свою очередь связано с функциональной инактивацией стретч-активируемых ионных каналов в сарколемме кардиомиоцитов.
3. Снижение общего синтеза белка в камбаловидной мышце в результате разгрузки можно частично предотвратить с помощью опорной стимуляции стопы крысы. На молекулярном уровне это воздействие позволяет снизить изменения в фосфорилировании анаболических маркеров и поддерживать сигнальную систему mTORC1 на физиологически оптимальном уровне, что приводит к повышенному по сравнению с контрольным вывешиванием синтеза белка в ответ на механический стимул.

Полученные результаты отличаются новизной. В частности, впервые нарушения в синтезе белка в мышце при разгрузке сопоставлены с подавлением фосфорилирования и

активации основных анаболических молекулярных маркеров 4E-B1, GSK-3 β и p90RSK, а также с функциональной инактивацией механочувствительных ионных каналов сарколеммы, что в совокупности может приводить к снижению эффективности трансляции в условиях разгрузки. Впервые показано влияние динамической опорной стимуляции стопы на анаболические сигнальные процессы внутри мышечного волокна на фоне кратковременной гравитационной разгрузки и частичное предотвращение с помощью этой процедуры механо-анаболической резистентности постуральной мышцы, что коррелирует с сохранением функциональной активности канонического сигнального пути IGF1-Akt/PKB/mTOR и снижением активности GSK-3 β .

Диссертационная работа написана в классическом стиле и состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 265 источников. Объем работы 130 страниц. Обзор литературы написан компактно и ясно, в нем систематизированы известные данные о молекулярных механизмах механотрансдукции в скелетных мышцах и подходах к компенсации негативного воздействия микрогравитации на опорно-двигательный аппарат. После ознакомления с этим разделом у читателя формируется достаточная база знаний для понимания результатов, полученных диссертантом, и их места в общей картине воздействия микрогравитации на постуральные мышцы. В разделе организация и методы исследований достаточно подробно описываются животные модели, физиологические и иммунохимические эксперименты, выполненные автором, приведены фотографии экспериментальных установок и контрольные записи мышечного сокращения. Дано описание статистического аппарата, примененного в исследовании. При ознакомлении с этим разделом можно заключить, что автор применял адекватные и современные методы исследования, позволяющие получать достоверные и воспроизводимые результаты. Вместе с тем имеются некоторые замечания к методу иммуноблоттинга и анализу результатов иммуноблоттинга (см. ниже). Раздел результаты исследования сформирован из коротких подразделов, состоящих из блотов, графиков, таблиц с экспериментальными значениями и краткого описания полученных данных. Таким образом, приведены как исходные данные (типичные блоты), так и усредненные расчетные результаты. Правда, не понятна величина выборки (см. ниже). Обсуждение полученных результатов проведено корректно в сопоставлении с данными литературы.

Основные замечания и вопросы по диссертационной работе следующие.

1. В обзоре литературы представлены схемы известных на данный момент молекулярных механизмов регуляции анаболических процессов в мышце. Это очень

полезно и удобно для читателя. Процессы и взаимодействия, отображенные на этих схемах, подробно описываются в тексте. Вместе с тем, схема на рисунке 4 (Схематическое представление сигнальных механизмов, ответственных за синтез белка на ранних сроках разгрузки) воспринимается с трудом. Из этой схемы довольно ясно, что происходит при нормальной механической нагрузке мышцы: с рецепторами на миоцитах связывается IGF-1, и далее активируются каскады внутриклеточной сигнализации, включающие IRS-1, PI3K, Akt, mTORC1 и другие регуляторы. В результате активируется синтез белка. А что же происходит при разгрузке? IGF-1 продолжает связываться с рецептором, но сигнал не проводится, или стимуляция рецепторов снижается? В тексте с описанием этой схемы впервые в работе возникает термин инсулиновая резистентность. Было бы уместно здесь же дать его определение.

На мой взгляд, представление схемы на рис. 4 в двух отдельных версиях – для нагрузки и для разгрузки, позволило бы более ясно донести до читателя информацию о механизмах работы систем внутриклеточной сигнализации при механической разгрузке скелетных мышц.

2. Использование в некоторых экспериментах разных блотов для нормировки фосфосигналов белков – потенциальный источник ошибок при расчетах. Желательно использовать одну и ту же мембрану для оценки количества и фосфорилированного, и общего белка. С этой целью рекомендуется использовать не нитроцеллюлозу, а более гидрофобную PVDF мембрану и опубликованные методы снятия с нее антител, например, протокол Yeung and Stanley, 2009.

3. На рис 13 тотальный 4E-BP1 состоит из двух полос, и верхняя из них мажорная, она же в основном и фосфорилируется. На рис. 17 преобладает нижняя полоса в тотальном 4E-BP1. Как это можно объяснить? Также интересно ведет себя и фосфорилирование полос 4E-BP1. Оно меняется со временем эксперимента, и не соответствует распределению тотальных полос (например, в 1HS). В чем возможная причина таких событий?

4. Ни в описании методов, ни в подписях к рисункам с экспериментальными данными, ни в таблицах не указано количество независимых опытов ($n = ?$).

5. Рис. 24 и таблица 5. Не понятно, как соотносятся данные по синтезу белка на рис. 24 и в таблице 5. Если данные берутся из рис. 24, то значение 7HS не может быть меньше значения 7HS+Gd независимо от варианта нормировки (вычесть контроль или разделить на контроль).

6. В работе не часто, но встречаются опечатки, например, на с. 35.

7. Нет термина «регуляции элонгации трансляции мРНК» (с. 37), вероятно, имелась в виду регуляция элонгации при трансляции мРНК. Следует писать испытуемые, а не испытатели (с. 39), когда речь идет об объектах исследования.

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают ценности полученных в работе результатов. Сделанные автором выводы представляются корректными и отражают суть полученных результатов. Результаты работы неоднократно доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах, по теме работы опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Представляемая Сергеем Александровичем Тыгановым диссертационная работа «Реализация механического сигнала в скелетной мышце млекопитающих на фоне гравитационной разгрузки» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой автором на основании выполненных исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение. Диссертационная работа С.А. Тыганова полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01– физиология.

Главный научный сотрудник
и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Национального медицинского исследовательского
центра кардиологии Минздрава России
доктор биологических наук, профессор

В.П. Ширинский

Ширинский Владимир Павлович
ул. 3-я Черепковская д. 15а, Москва, 121552, Россия
эл. почта: shirinsky@gmail.com
тел.: 8495-414-7246



«Подпись д.б.н., профессора В.П. Ширинского заверяю»

Ученый секретарь ИЭК НМИЦ кардиологии МЗ РФ
доктор медицинских наук

О.С. Плеханова

07.06.2019