

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Кравцовой Виолетты Васильевны «ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ Na,K-АТФазы В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Актуальность темы исследования

Сократительная активность скелетной мускулатуры, масса которой составляет около 40% от всей массы тела, является исключительно важным фактором обеспечения полноценного функционирования всех систем организма. Снижение двигательной активности приводит к уменьшению мышечной массы, сократительной дисфункции и другим многочисленным нарушениям атрофического характера. Молекулярные механизмы, лежащие в основе таких нарушений, включая их начальные этапы, которые могут играть роль триггеров для последующих сигнальных событий, вызывающих атрофию, во многом остаются неясными. В частности, большой практический интерес вызывает изучение пускового механизма развития мышечной атрофии в условиях реальной и моделируемой невесомости. В связи с этим неслучаен исключительно высокий интерес к данной проблеме, что видно из огромного количества публикаций, посвященных механизмам функционирования скелетных мышц в норме и при различных формах нарушения двигательной активности.

Среди механизмов поддержания электрогенеза, возбудимости и сократительной функции скелетных мышц критически важным фактором является активность Na,K-АТФазы. Физиологическая роль Na,K-АТФазы в скелетных мышцах является предметом интенсивного изучения, которое серьезно осложнено не только существованием различных молекулярных форм этого транспортного белка, но также их специфической мембранной локализацией, особенностями регуляции и взаимодействия с молекулярным окружением. Хотя Na,K-АТФаза является поистине витальным белком, проблема изоформ-специфичности её функционирования в скелетной мышце далека от решения. В частности, особое значение активность Na,K-АТФазы имеет для поддержания электрогенеза постсинаптической области мышечной мембраны, где происходит трансформация локального потенциала концевой пластинки в распространяющийся потенциал

действия, что определяет надежность нервно-мышечной передачи в целом. Однако особенности локализации, функционирования и молекулярных взаимодействий Na,K-АТФазы в этой области сарколеммы не исследованы. Перспективными для дальнейшего изучения изоформ-специфичности функционирования Na,K-АТФазы в скелетной мышце также являются экспериментальные модели нарушений двигательной активности, приводящие к развитию различных форм миопатии, причем особый интерес представляет начальный этап двигательной разгрузки, исследованный явно недостаточно. Важной проблемой является изучение функционального взаимодействия Na,K-АТФазы с мембранным холестерином, практически не исследованного в скелетной мышце. Аналогичная ситуация сложилась и в области изучения эффектов дигиталисоподобных ингибиторов Na,K-АТФазы и их циркулирующих эндогенных аналогов.

В связи с этим, диссертационное исследование В.В. Кравцовой, посвященное комплексному подходу к решению перечисленных проблем, а также ряда других принципиально важных вопросов, безусловно, является весьма актуальным и серьезно продвигает наши знания в области молекулярных механизмов пластичности скелетной мышцы.

Научная новизна исследования и научно-практическая значимость полученных результатов

Новизна данной работы во многом определяется комплексным подходом к исследованию функционального разнообразия Na,K-АТФазы в скелетной мышце с использованием широкого арсенала самых современных методов и подходов. Это не только электрофизиологические исследования с применением микроэлектродной техники и механография, но также методы иммуноцитохимии и конфокальной микроскопии, метод ПЦР в режиме реального времени и Вестерн-блот анализ, метод пламенной фотометрии, фармакологический анализ.

К приоритетным результатам диссертации следует отнести впервые полученные автором убедительные доказательства специфики локализации $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы и ее функционального взаимодействия с никотиновыми холинорецепторами и мембранным холестерином. Важно, что это взаимодействие является основой физиологического механизма поддержания потенциала покоя

постсинаптической мембраны. Автором установлены особенности этих межмолекулярных взаимодействий и показано, что конформационный переход никотиновых холинорецепторов в состояние десенситизации является модулирующим сигналом для $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы. Впервые получены доказательства реципрокного взаимодействия между $\alpha 2$ -изоформой и холестерином липидных плотиков (рафтов).

К важнейшим относятся также доказательства того, что кратковременное снижение двигательной активности по-разному влияет на постсинаптический и внесинаптический пулы $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы без нарушения её локализации в сарколемме. Эти функциональные изменения $\alpha 2$ -изоформы носят адаптационный характер и сопровождаются рядом структурно-функциональных перестроек. В частности, наблюдается дестабилизация липид-упорядоченной фазы сарколеммы за счет частичной утраты мембранного холестерина; нарушается структура концевых пластинок. Впервые показано, что $\alpha 2$ -изоформа Na,K-АТФазы может участвовать в регуляции сократительной функции скелетной мышцы эндогенными кардиотоническими стероидами.

Наконец, проведенный комплексный анализ позволил автору сделать вывод о функциональной пластичности $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы по сравнению с функционально стабильной $\alpha 1$ -изоформой, что является крупным достижением в этой области физиологии.

Необходимо подчеркнуть, что значимость этой работы не ограничивается получением фундаментальных знаний о молекулярных перестройках в процессе адаптации постуральной мышцы к гравитационной разгрузке в условиях реальной и моделируемой невесомости. Область применения полученных данных значительно шире, поскольку выявление молекулярных механизмов подобных функциональных нарушений открывает новые перспективы при поиске методов их коррекции и профилактики, проблем, исключительно востребованных не только в космической, но и в реабилитационной медицине.

Таким образом, новизна и научно-практическая ценность полученных автором экспериментальных данных не вызывают сомнений.

Степень обоснованности научных положений, рекомендаций и выводов, сформулированных в диссертации

Результаты экспериментов хорошо документированы, иллюстративный материал обширен и свидетельствует о высоком качестве полученных результатов. Все исходные данные тщательно обработаны и подвергнуты разностороннему анализу. Обсуждение и оценка собственных результатов проведены автором корректно и не вызывают возражений. При обсуждении результатов рассмотрены различные варианты трактовок с привлечением обширного списка публикаций по данной проблеме. Статистическая обработка данных произведена с помощью адекватных современных программ.

Результаты диссертационного исследования В.В. Кравцовой доложены на многочисленных съездах, симпозиумах и конференциях, в том числе международных. По теме диссертации опубликовано 25 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 20 входят в международные базы научного цитирования Web of Science Core Collection и Scopus; 5 статей в других изданиях.

Учитывая обширный экспериментальный материал, самый современный уровень исследований и анализа результатов, апробацию работы на достаточно большом числе отечественных и международных научных собраний, новизна исследования и достоверность выводов не вызывает никаких сомнений.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному принципу и изложена на 236 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных результатов и их обсуждения, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы из 416 наименований (37 отечественных и 379 зарубежных источников). Диссертация иллюстрирована 62 рисунками и 3 таблицами.

Во «Введении» кратко изложена суть проблемы, обоснованы и сформулированы цели и задачи исследования, а также 3 положения, выносимые на защиту. Данная часть диссертации четко соотносится с выводами, сделанными в конце работы на основании анализа полученных результатов.

Глава «Обзор литературы» представляет собой общий анализ современных представлений по рассматриваемой проблеме: даются основные сведения о Na,K-АТФазе, её структуре и молекулярном разнообразии, особенностях функционирования, включая данные о сигнальной роли этого белка, подробно описаны изоформы Na,K-АТФазы в скелетной мышце, их локализация, а также специфичность регуляции различными факторами. В этой главе дается анализ степени изученности проблемы. Обзор написан хорошим литературным языком, автор успешно отразил данные большого количества современных исследований по изучаемой проблеме. В целом, обзор литературы свидетельствует о хорошем знании автором современного состояния в данной области и является солидным теоретическим фундаментом, используемым в дальнейшем для описания и обсуждения результатов. Эта часть работы также позволила автору не только охарактеризовать всю проблему в целом, но и логически обосновать цель и задачи исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» дается общая характеристика лабораторных животных, используемых в исследовании, описаны экспериментальные процедура и растворы. В опытах был использован широкий арсенал методик, включающий методы микроэлектродной регистрации, механографии, конфокальной микроскопии, пламенной фотометрии, количественной полимеразной цепной реакции, Вестерн-блот анализа, иммуногистохимии, фармакологического анализа и др. Описаны методы двигательной разгрузки задних конечностей крысы, опыты с хроническим действием никотина, методы статистической обработки. Условия проведения опытов описаны весьма квалифицированно и достаточно подробно. Эта часть дает необходимую информацию о методических особенностях данной работы. Корректность выбора объектов исследования, а также современность и адекватность методических приемов не вызывают сомнений.

Каждая из 4-х глав, содержащих результаты собственных исследований, состоит из введения в конкретную проблему, описания непосредственно полученных результатов и их обсуждения. Главы посвящены исследованию локализации и функционирования $\alpha 2$ -изоформы Na,K-АТФазы в концевой пластинке; механизмам хронического действия никотина в скелетной мышце;

изоформ-специфичности влияния двигательной разгрузки на Na,K-АТФазу; проблеме влияния кардиотонических стероидов на сократительную функцию. Эти главы представляют собой основную часть диссертационной работы. Диссертация завершается общим «Заключением», посвященным осмыслению и интеграции полученных данных.

На основании полученных результатов сделано 7 выводов, которые логически вытекают из результатов и полностью соответствуют целям и задачам исследования.

Автореферат содержит описание основных наиболее значимых серий экспериментов и их обсуждение и полностью отражает основное содержание работы.

Диссертация изложена хорошим научным и литературным языком, не вызывает принципиальных замечаний ни по форме, ни по содержанию.

Вопросы и замечания к работе

В ходе знакомства с работой возникли следующие вопросы:

- 1) Что известно о функционировании Na,K-АТФазы при хронических нарушениях двигательной активности?
- 2) Что известно о возможности коррекции структурно-функциональных нарушений концевых пластинок при двигательной дисфункции?
- 3) Могут ли наблюдаемые Вами изменения при двигательной разгрузке быть связаны с воздействием стрессорных факторов?

Из замечаний к данной работе можно отметить единичные опечатки и некоторые стилистические погрешности.

Необходимо отметить, что имеющиеся вопросы и сделанные замечания несколько не снижают общую самую высокую оценку диссертационной работы В.В. Кравцовой.

Заключение

Диссертация В.В. Кравцовой на тему «ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ Na,K-АТФазы В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология, является завершенной научно-квалификационной работой,

направленной на решение актуальной проблемы в области мышечной физиологии. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа В.В. Кравцовой соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Кравцова Виолетта Васильевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология.

21 мая 2018 г.

Официальный оппонент:

Юрий Петрович Герасименко,
член-корр. РАН, доктор биологических наук,
профессор, заведующий лабораторией
физиологии движения, ФГБУН Институт
физиологии имени И.П. Павлова РАН

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН.
Телефон: +7(812) 328-11-01, e-mail: yger@pavlov.infran.ru



Ю.П. Герасименко

Подпись Ю.П. Герасименко заверяю:



Подпись руки
подтверждена
подлинностью

Герасименко Ю.П.
Ю.П.