

В Диссертационный совет
Д 212.232.10 при ФГБОУ ВО
«Санкт-Петербургский
государственный университет»

**Отзыв официального оппонента Тарасовой Ольги Сергеевны
на диссертационную работу Кравцовой Виолетты Васильевны
«Функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы в скелетной мышце»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.03.01 - Физиология**

Актуальность проблемы.

Диссертационная работа В.В.Кравцовой посвящена изучению механизмов функционирования Na,K-АТФазы – фермента, который играет ключевую роль в поддержании ионного гомеостаза клеток скелетной мышцы. В скелетной мышце Na,K-АТФаза экспрессируется в двух молекулярных формах (α_1 и α_2), которые существенно различаются по локализации в клетке и функциональной принадлежности. Несмотря на то, что Na,K-АТФаза, в особенности ее α_2 изоформа, являются предметом интенсивного исследования, многогранность ее клеточных функций ставит все новые и новые важные вопросы, которые требуют экспериментального исследования и теоретического осознания. Как показано в последние годы, кроме ион-транспортной роли Na,K-АТФаза является рецептором эндогенных кардиотонических стероидов и участвует во внутриклеточной сигнализации. Благодаря взаимодействию с разнообразными белками и липидами клетки она является участником многих молекулярных ансамблей, регулирующих важнейшие клеточные функции в норме и при патологических изменениях в организме. В связи с этим актуальность изучения различных аспектов функционирования Na,K-АТФазы в скелетной мышце, включая проблематику работы В.В.Кравцовой, не вызывает сомнений.

Структура работы.

Диссертационная работа В.В.Кравцовой изложена на 236 страницах и включает введение, обзор литературы, характеристику материалов и методов исследования, четыре главы результатов (каждая из них снабжена обсуждением полученных данных), обобщающего заключения и выводов. Работу завершает объемный список цитируемой литературы, он включает 416 наименований, из них 37 русскоязычных.

Автореферат достаточно полно и корректно передает содержание диссертационной работы и оформлен надлежащим образом.

Общая характеристика работы.

Работа В.В.Кравцовой является образцовым примером комплексного подхода к изучению фундаментальной физиологической проблемы. Несомненным достоинством работы является использование широкого набора

современных методик, среди которых как классические (микроэлектродная регистрация мембранного потенциала клеток, регистрация сократительной активности мышечных препаратов *in vitro*), так и современные, требующие особых навыков и использования неординарного оборудования (конфокальная флуоресцентная микроскопия, пламенная фотометрия, количественная ПЦР и Вестерн блоттинг). В.В.Кравцовой удалось стать центром международного коллектива, включающего ведущих физиологов нашей страны, Дании и Швеции. В работе получен обширный массив приоритетных экспериментальных данных, тщательно выполнены контрольные эксперименты, проведена грамотная статистическая обработка результатов, а также достаточно полное их обсуждение.

Первая часть работы (наиболее интересная, на мой взгляд) представляет собой фундаментальное исследование роли изоформ Na,K-АТФазы в функционировании концевой пластинки. Она исторически восходит к классическим экспериментам Бернарда Катца, открытию феномена неквантового высвобождения ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе, которое обеспечивает накопление и деполяризующее влияние ацетилхолина в синаптической щели в условиях ингибирования ацетилхолинэстеразы. Важным достижением В.В.Кравцовой является установление механизма действия неквантового ацетилхолина в естественных для синапса условиях, т.е. при работающей системе его энзиматической деградации. Впервые показано, что в низких концентрациях ацетилхолин оказывает противоположное (гиперполяризующее) влияние, что обусловлено активацией α_2 изоформы Na,K-АТФазы путем ее белок-белкового взаимодействия с никотиновыми холинорецепторами концевой пластинки. В этой же части работы впервые проведен анализ роли липидного окружения и белков цитоскелета в специфической локализации и функциональной активности Na,K-АТФазы в синапсе.

Вторая часть работы посвящена изучению хронических эффектов никотина при разных способах применения – путем аппликации на мышцу, а также при системном (подкожном и пероральном) введении в организм. В этой части работы показано, что никотин при длительном действии в низких концентрациях вызывает изменения электрогенной активности Na,K-АТФазы в скелетных мышцах крысы, причем в зависимости от способа применения более выраженным изменениям может подвергаться определенная (α_1 или α_2 изоформа). Полученные здесь результаты обеспечивают понимание механизмов вредоносного влияния табакокурения, а также могут оказаться полезными для медицинской токсикологии.

В третьей части работы В.В. Кравцовой изучены изоформ-специфические изменения Na,K-АТФазы в постуральной мышце крысы при снижении уровня ее сократительной активности в модели гравитационной разгрузки. На самом деле, затрагиваемая здесь проблема намного шире, поскольку полученные результаты можно проецировать на мышцы людей, которые в результате заболеваний оказываются прикованными к постели или же вынуждены

ограничить уровень своей двигательной активности. В этой важной части работы В.В.Кравцовой впервые показано, что двигательная разгрузка сопровождается быстрым снижением активности α_2 изоформы Na,K-АТФазы в области концевой пластинки, а также во внесинаптическом регионе, причем это связано со структурными изменениями концевой пластики, а также с генерализованными перестройками липидного бислоя.

Наконец, в последней части работы затронута новая и актуальная проблема взаимодействия Na,K-АТФазы с эндогенными кардиотоническими стероидами. Впервые показано положительное инотропное влияние убаина и маринобуфагина при применении этих лигандов в очень низких (физиологических) концентрациях.

Публикации по результатам исследований.

Список работ, опубликованных по теме диссертации, поражает своим объемом и качеством. Он включает 25 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, включая такие авторитетные издания как American Journal of Physiology, The Journal of General Physiology, The Journal of Biological Chemistry и др. Результаты диссертационной работы неоднократно обсуждались на ведущих российских и международных конференциях и симпозиумах.

Замечания.

Принципиальных замечаний к работе В.В.Кравцовой у меня не возникло. В качестве пожеланий можно отметить следующие моменты.

1. На мой взгляд, при анализе результатов следует уделять более пристальное внимание функциональным особенностям объекта исследования. В данной работе объектами служили две мышцы – камбаловидная и диафрагма, которые существенно различаются по миозиновому фенотипу (камбаловидна почти исключительно состоит из медленных волокон I типа, а в диафрагме таких волокон меньше – около 40%). Как видно из полученных данных, мышечные волокна этих мышцы различаются по уровню мембранного потенциала (рис. 3.2) и электрогенному вкладу изоформ Na,K-АТФазы в синаптической области (рис. 3.4). Непонятно, связаны ли выявленные электрофизиологические различия с миозиновым фенотипом мышечных волокон.
2. При исследовании утомления камбаловидной мышцы после подшивания геля с никотином проводилась стимуляция короткими высокочастотными пачками импульсов (рис. 4.6). Такой режим сократительной активности нетипичен для этой мышцы (частота стимулов слишком высокая для медленных двигательных единиц).
3. При описании экспериментальных серий с хроническим применением никотина следовало бы привести более подробную характеристику моделей, включая изменение массы тела животных в течение эксперимента, массы мышц, объем потребляемой жидкости (при пероральном применении вещества).

Вопросы.

1. Можно ли устранить различие в уровне мембранного потенциала между синаптическим и внесинаптическим регионами путем фармакологического подавления некантового высвобождения ацетилхолина, например, с применением гемихолина (Nikolsky et al. Pflugers Arch. 1991 418(1-2):74-8; Abramochkin et al. Exp Physiol. 2010 Feb;95(2):265-73)?
2. В работе показано, что хроническое применение никотина путем подкожных инъекций приводит к подавлению активности α_2 изоформы Na,K-АТФазы, тогда как при пероральном применении вещества наблюдается снижение активности α_1 изоформы, хотя суточные дозы никотина были сопоставимыми. Чем обусловлена такие изоформ-специфические эффекты никотина? Не могут ли эффекты «перорального» никотина зависеть от его метаболизма в печени, куда он попадает после всасывания в пищеварительном тракте?
3. Через 72 ч двигательной разгрузки в камбаловидной мышце крысы наблюдается снижение возбудимости мышечных волокон (рис. 5.5), которое автор объясняет повышением проводимости мембраны или же частичной инактивацией натриевых каналов в результате развившейся деполяризации. Нельзя ли объяснить снижение возбудимости просто уменьшением размеров мышечных волокон (увеличением их входного сопротивления)?
4. Почему у крыс выносливость камбаловидной мышцы снижена после 24-ч двигательной разгрузки, но не изменена через 72 ч (рис. 5.7)?
5. Инотропные эффекты кардиотонических стероидов автор объясняет их влиянием на мышечный электрогенез. Нельзя ли для объяснения полученных результатов привлечь данные литературы о запуске с участием Na,K-АТФазы внутриклеточных сигнальных каскадов?

Заключение. Результаты диссертационной работы В.В.Кравцовой достоверны, сформулированные в ней научные положения и выводы полностью обоснованы. Диссертационная работа В.В.Кравцовой, является ценной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны принципиально новые теоретические положения о функциональной роли изоформ Na,K-АТФазы, совокупность которых можно квалифицировать как важное научное достижение, заслуживающее пристальное внимание и уважение научной общественности.

Результаты работы характеризуется высокой научной новизной, они важны для развития биологических наук, фундаментальной и клинической медицины. Полученные экспериментальные данные могут служить теоретической основой для разработки новых подходов к медикаментозной и функциональной коррекции нарушений скелетных мышц при длительном снижении уровня их сократительной активности, а также представляют несомненный интерес для преподавания физиологических курсов. Считаю нужным отметить, что сведения о роли Na,K-АТФазы в функционировании нервно-мышечного синапса уже включены в программы читаемых мною

учебных курсов для студентов биологического факультета (курс «Физиология висцеральных систем: современные проблемы») и факультета фундаментальной медицины (курс «Нервная регуляция висцеральных функций») Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, диссертация Кравцовой Виолетты Васильевны на тему «Функциональная гетерогенность Na,K-АТФазы в скелетной мышце», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01–физиология, по содержанию, актуальности и научной новизне, объему экспериментального исследования, теоретическому и практическому значению полученных данных соответствует критериям п.9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а её автор Кравцова Виолетта Васильевна заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.01– физиология.

Официальный оппонент:

Профессор кафедры физиологии человека и животных
биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
доктор биологических наук, доцент

О.С. Тарасова

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Тел. +7(495) 939-14-16 (раб.), +7(926)711-52-47 (моб.),
адрес электронной почты: ost.msu@gmail.com

Подпись руки профессора Тарасовой О.С. заверяю



Декан биологического факультета МГУ
имени М.В.Ломоносова, академик
М.П.Кирпичников

« 21 » _____ 2018 г.