

УТВЕРЖДАЮ

Ректор федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Рязанский государственный
медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор

«15» октября 2024 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Диссертация «Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии С2С12» выполнена на кафедре биологической химии.

В период подготовки диссертации соискатель Исаева Мария Олеговна работала ассистентом кафедры биологической химии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

В 2020 году окончила федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности «Медико-профилактическое дело».

Справка о сдаче кандидатских экзаменов № 1812 выдана в 2024 году федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением

высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: Абаленихина Юлия Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологической химии, профессор кафедры.

По итогам обсуждения диссертации принято следующее заключение:

Актуальность темы исследования

Скелетная мышечная ткань обладает способностью регенерировать в ответ на воздействие внешних и внутренних повреждающих факторов. Восстановление миофибрилл происходит за счет активации клеток – сателлитов, располагающихся между базальной мембраной и сарколеммой. Миогенез – сложный процесс эмбрионального и постэмбрионального образования мышечной ткани, включающий в себя несколько стадий: пролиферация, дифференцировка и формирование миотрубочек с созреванием в миофибриллы.

Одними из главных регуляторов, участвующих в развитии и восстановлении мышечной ткани являются транскрипционные факторы, которые включают в себя белок детерминации миофибрилл 1 (MyoD), миогенный фактор 5 (Myf5), геркулин (MRF4) и миогенин (MyoG). Согласно литературным данным MyoD экспрессируется на раннем этапе миогенеза, что указывает на его участие в дифференцировке миофибрилл. Экспрессия Myf5 идет в миосателлитах, следовательно данный фактор регулирует пролиферацию миофибрилл. MRF4 экспрессируется в зрелом миофибрилле, контролируя рост мышечной ткани. А экспрессия MyoG происходит на позднем этапе, данный фактор регулирует терминальную дифференцировку и формирование миотрубочек.

Янтарная кислота – метаболит цикла трикарбоновых кислот, а также источник протонов водорода для II комплекса дыхательной цепи

(сукцинатдегидрогеназы). В настоящее время имеются свидетельства того, что метаболиты цикла Кребса играют важную роль и за пределами цикла. Так, янтарная кислота является внеклеточным лигандом, сопряженного с G-белком рецептора, известного как рецептор сукцината 1 (SUCNR1, GPR91). SUCNR1 экспрессируется в почках, печени, сердце, клетках сетчатки и, вероятно, во многих других тканях. Кроме этого, показано, что янтарная кислота проявляет свое действие через HIF-1 α , что может иметь особенное значение при гипоксии мышечной ткани.

В настоящее время появляются работы, демонстрирующие участие янтарной кислоты в регуляции ремоделирования мышц в ответ на физическую нагрузку, при этом подчеркивается роль сукцинатных рецепторов в этом процессе. Тем не менее, молекулярный механизм воздействия янтарной кислоты на миогенез мышечных клеток, в частности C2C12, остается не изученным аспектом. Янтарная кислота входит в состав различных биологически активных добавок и лекарственных средств. Одним из таких примеров является этилметилгидроксипиридина сукцинат, который используется как антиоксидантное и нейропротекторное средство, улучшает метаболизм и кровоснабжение мозга, стабилизирует клеточные мембраны.

Таким образом, механизмы воздействия янтарной кислоты на миогенез клеток линии C2C12 на данный момент не изучались, поэтому тема диссертационного исследования является актуальной. Полученные результаты работы по механизмам регуляции миогенеза, в том числе транскрипционным факторам, участвующим в данном процессе, могут быть использованы в качестве инструмента запуска регенерации скелетной мышечной ткани в клетках линии C2C12. Определение ключевой роли SUCNR1 в механизме действия янтарной кислоты, позволит рассматривать сукцинатные рецепторы в качестве фармакологической мишени, что дополнит представление о возможностях терапевтического применения янтарной кислоты для улучшения функций и восстановления мышечной ткани.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Автор самостоятельно составила обзор литературы по рассматриваемой проблеме, разработала план исследования, выполнила эксперименты *in vitro*, биохимические исследования, а также обработала и интерпретировала полученные данные, подготовив публикации по материалам диссертации. Вклад автора в проведенное исследование составляет более 90%.

Объем и характер заимствованных фрагментов текста диссертации позволяют считать их законными цитатами.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Диссертационная работа выполнена на современном научном уровне с использованием статистических методов. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), множественные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта в тексте указано точное значение критерия Фишера (F), критический уровень значимости принимали при $p < 0,05$. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и графиках представлены в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ($\pm SD$) при нормальном распределении данных.

В работе использованы современные методы: микроскопический, вестерн-блот, ВЭЖХ МС/МС.

Научные положения, выводы и рекомендации основаны на достаточном количестве экспериментальных исследований со статистической обработкой результатов с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» и «GraphPad Prism 10».

Достоверность первичных материалов подтверждена их экспертной оценкой и не вызывает сомнений. Научные положения, полученные выводы и практические рекомендации достаточно обоснованы и логически вытекают из результатов исследования. В исследовании использован достаточный объем литературных источников как отечественных, так и зарубежных авторов.

Новизна результатов проведенных исследований

В ходе выполнения работы на клетках линии C2C12 *in vitro* впервые показана

роль янтарной кислоты в процессе миогенеза клеточной линии C2C12: повышение уровня специфических белков мышечной ткани – α -актина, MYH; транскрипционных факторов – MyoD, MyoG; индекса миогенеза; снижение относительного количества сукцинатных рецепторов (SUCNR1) и ускоренное превращение миобластов в миотубулы. Установлено, что механизм воздействия янтарной кислоты на SUCNR1 реализуется посредством Gai-белка. Выявлено, что HIF-1 α и PXR не принимают участия в процессе миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 при воздействии янтарной кислоты. Доказано стимулирующее действие этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез клеточной линии C2C12, реализующиеся через SUCNR1 – Gai – сигнальный путь, предположительно за счет молекулы янтарной кислоты, входящей в его состав.

Практическая значимость результатов проведенных исследований

Результаты работы имеют важное практическое значение.

При дальнейшем проведении дополнительных исследований полученные результаты работы могут быть использованы для создания новых препаратов и методов лечения заболеваний, связанных с нарушениями функций мышечной ткани, таких как миопатии, саркопения, а также при реабилитации после травм. Янтарная кислота может быть интегрирована в программы спортивного питания и восстановления, что позволит улучшить результаты тренировок, ускорить восстановление мышц после нагрузок и повысить общую спортивную продуктивность. Этилметилгидроксипиридина сукцинат уже применяется для лечения заболеваний, связанных с неврологическими и сердечно-сосудистыми патологиями. За счет того, что препарат стимулирует миогенез, это открывает новые перспективы его применения в терапии мышечных заболеваний, таких как мышечные дистрофии, миозиты, травмы и возрастная атрофия мышц. Изучение в клинической практике позволит использовать этилметилгидроксипиридина сукцинат для реабилитационных программ, направленных на восстановление двигательной активности и мышечной силы у пациентов с неврологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Ценность научных работ соискателя

Полученные научные данные по механизмам регуляции миогенеза, в том числе транскрипционным факторам, участвующим в данном процессе, могут быть использованы в качестве инструмента запуска регенерации скелетной мышечной ткани в клетках линии C2C12. Определение ключевой роли SUCNR1 в механизме действия янтарной кислоты, позволит рассматривать сукцинатные рецепторы в качестве фармакологической мишени, а также дополнит представление о возможностях терапевтического применения янтарной кислоты для улучшения функций и восстановления мышечной ткани.

Специальность, которой соответствует диссертация

Диссертация посвящена исследованию молекулярных механизмов реагирования клеточных компонентов на проникающую янтарную кислоту и определению ее участия в процессе дифференцировки клеточной линии C2C12. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.4. Биохимия (медицинские науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, полно отражающих основные положения диссертации, в том числе 4 статьи в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, из которых 3 публикации в журналах, входящих в цитатно-аналитическую базу данных Scopus, получено 2 патента РФ на изобретение.

1. Влияние этилметилгидроксипиридина сукцината на миогенез *in vitro* / Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т.85, №5. – С. 3-7. (Соавт. Порошина М.О., Рябков А.Н., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.)

2. Изменение показателей миогенеза клеточной линии C2C12 при воздействии сукцината *in vitro* / М.О. Исаева [и др.]. – Текст: непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2024. – Т. 27, № 1. – С. 92-99. (Соавт. Абаленихина Ю.В., Гаджиева Ф.Т., Щулькин А.В., Якушева Е.Н.)

3. Механизм стимуляции миогенеза под действием этилметилгидроксипиридина сукцината / Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст: непосредственный // Химико-фармацевтический журнал. – 2024. – Т.58, №6. – С. 10-17. (Соавт. Исаева М.О., Щулькин А.В., Ананьева П.Д., Якушева Е.Н.)

4. Mechanism of stimulation of myogenesis under the action of Succinic Acid through the Succinate Receptor SUCNR1 / Yu.V. Abalenikhina [et all.]. // Biochemistry (Moscow). – 2024. – Vol. 89, No. 7. – P. 1325-1335. (Co-author. Isayeva M.O., Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N.)

5. Патент RU 2776045 С1 РФ. Способ стимуляции миогенеза / Абаленихина Ю.В., Порошина М.О., Щулькин А. В., Якушева Е.Н., Попова Н.М.; заявитель и патентообладатель – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 2021131169; зарегистр. 13.12.2021; опубл. 12.07.2022.

6. Патент RU 2780589 С1 РФ. Способ активации миогенной дифференцировки миобластов / Абаленихина Ю.В., Порошина М.О., Щулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н. М.; заявитель и патентообладатель – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – 2021129689; зарегистр. 12.10.2021; опубл. 28.09.2022.

Диссертация «Механизмы влияния янтарной кислоты на процесс дифференцировки клеток линии С2С12» Исаевой Марии Олеговны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на межкафедральном заседании кафедр: биологической химии; фармацевтической химии и фармакогнозии; фармацевтической технологии; фармакологии; профильных гигиенических дисциплин; математики, физики и медицинской информатики; биологии; сердечно-сосудистой,

