

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Тверского Артёма Михайловича
на тему: «Анализ механизма цитотоксического действия
кардиотонических стероидов»
по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Диссертационная работа А.М. Тверского посвящена изучению цитотоксического эффекта кардиотонических стероидов (КТС), включая изучение особенностей взаимодействия этих соединений с различными изоформами Na,K-АТРаза, отличающихся чувствительностью к убаину. Кардиотонические стероиды, представляют собой вещества природного (в основном растительного) происхождения, которые на протяжении длительного времени использовались в медицине в качестве кардиологических средств. В настоящее время показано, что Na,K-АТРаза является их единственным рецептором. Кроме того, в конце 20-го столетия было установлено, что кардиотонические стероиды, включая наиболее известный из них, убаин, в крайне низких концентрациях присутствуют в организмах млекопитающих и выполняют функции гормонов. Еще в 1959 году было установлено, что убаин оказывает ингибирующее действие на Na,K-АТРаза. С тех пор соединения этого класса рассматриваются как ингибиторы этого фермента. Однако в последнее время обнаружено, что, связываясь с Na,K-АТРазой, они способны также инициировать тканеспецифичные сигнальные каскады, приводящие к различным физиологическим эффектам, в том числе и вызывающие гибель клеток. Эти сигнальные каскады инициируются при связывании кардиостероидов с Na,K-АТРазой, что приводит к изменению ее конформации и вызывает связывание с ферментом вспомогательных белков, активирующих эти каскады. По последним данным пациенты с сердечной недостаточностью, которых лечат с использованием кардиостероидов, значительно реже болеют некоторыми

формами рака. Поэтому изучение механизмов взаимодействия кардиостероидов с Na,K-АТФазой имеет не только актуальное фундаментальное, но и практическое значение, поскольку кардиостероиды в настоящее время рассматриваются как перспективные противораковые препараты. На основании вышеизложенного можно считать, что тема диссертационной работы А.М. Тверского актуальна, а сама работа важна как в фундаментальном, так и в прикладном отношении.

Диссертационная работа А.М. Тверского написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание используемых материалов и методов, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы (285 источников). Материал изложен на 156 страницах, включает 11 таблиц, 61 рисунок и приложение.

Первая глава работы А.М. Тверского представляет собой подробный обзор данных литературы о структуре и механизме функционирования Na,K-АТФазы, механизмах действия кардиотонических стероидов (КТС), изоформах фермента и их различной чувствительности к КТС, а также о возможных механизмах их цитотоксического действия, которые могут быть как Na-зависимыми, так и Na-независимыми. Подробно рассмотрено влияние кардиостероидов на экспрессию генов. В целом обзор производит хорошее впечатление, подготавливает читателя к пониманию стоящих перед исследователем задач. Однако некоторые части обзора содержат избыточную детальную информацию, которая не имеет прямого отношения к теме диссертации. Например, на мой взгляд, излишние подробности приведены в разделе, описывающем катион-связывающие центры фермента. Из обзора литературы становится понятна цель исследования и задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели.

Вторая глава посвящена описанию методов исследования. Работа выполнена с применением широкого набора современных биохимических и биофизических методов, таких как: - культивирование клеток, радиоизотопный метод определения концентраций катионов, фазово-

контрастная микроскопия, получение очищенных препаратов Na,K-АТФазы методом дифференциального центрифугирования, электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг, методы кинетического анализа, метод изометрической калориметрии титрования и, наконец, метод молекулярного моделирования. Этот раздел очень хорошо оформлен и содержит детальную информацию обо всех экспериментальных подходах, использованных в работе.

В третьей главе диссертационной работы представлены полученные результаты исследования и их обсуждение. Эта глава делится на девять разделов. В первом разделе, установлено, что ингибитор Na,K-АТФазы, убаин, индуцирует примерно одинаковое изменения концентраций ионов Na^+ и K^+ в клетках эндотелия человека и крысы, (содержащих чувствительную и резистентную к убаину $\alpha 1$ -субъединицу Na,K-АТФазы), вызывает гибель клеток человека, но не влияет на жизнеспособность клеток эндотелия крысы. Инкубация клеток эндотелия человека и крысы в среде без калия, приводит к такому же изменению соотношения $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$, как и добавление убаина, но не вызывает гибель клеток. Эти данные говорят о том, что нарушение градиента ионов Na^+ и K^+ недостаточно для реализации токсического действия убаина. А гибель, по-видимому, связана с конформационными изменениями каталитической ($\alpha 1$) субъединицы фермента. Последнее доказано диссертантом с использованием изящных экспериментов, в которых с помощью генетических методов была проведена экспрессия чувствительной к убаину (S) $\alpha 1$ -субъединицы человека в клетках мышей. Экспрессия этой субъединицы Na,K-АТФазы у мышей, содержащих в норме резистентную изоформу фермента, привела к индукции гибели клеток под действием убаина, что не характерно для мышей дикого типа. Автором высказано предположение, что гибель клеток обусловлена изменением конформации чувствительного к кардиостероидам фермента и рекрутированием за счет этого белка-партнера, который инициирует сигнальный каскад, приводящий к гибели клеток.

В связи с этим последующие эксперименты были направлены на изучение характера связывания кардиотонических стероидов с двумя изоформами Na,K-АТФазы (чувствительной и нечувствительной к КТС), кинетики ингибирования этих изоформ и конформационных переходов, индуцированных связыванием кардиостероидов.

Сравнение кинетики ингибирования чувствительной и нечувствительной к кардиостероидам изоформ Na,K-АТФазы тремя кардиостероидами показало, что убаин и дигоксин являются псевдонеобратимыми ингибиторами чувствительной изоформы, тогда как маринобуфагенин ингибирует эту изоформу обратимо. Установлено также, что связывание кардиостероидов происходит в двух центрах с положительными кооперативными взаимодействиями между ними. Поскольку в α -субъединице есть только один центр связывания кардиостероидов, то автор предположил, что в E2-P конформации происходит взаимодействие между двумя связывающими центрами в димере Na,K-АТФазы. Изучение связывания кардиостероидов методом изометрической калориметрии выявило, что сродство кардиостероидов к чувствительной изоформе Na,K-АТФазы снижается в ряду убаин, дигоксин, маринобуфагенин, причем основной вклад в энергию связывания вносит энтальпийный фактор.

Крайне интересными оказались результаты, представленные в разделе, где описаны изменения конформации резистентной и чувствительной изоформ Na,K-АТФазы, происходящие при связывании кардиостероидов. В качестве метода исследования был использован известный метод ограниченного трипсинолиза, когда анализ конформации проводится путем сравнения пептидов после протеолиза. Оказалось, что чувствительная изоформа принимает различную конформацию при связывании убаина и маринобуфагенина. В то же время связывание любого из трех кардиотонических стероидов не влияло на конформацию резистентной Na,K-АТФазы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу

того, что именно изменение конформации чувствительной к убаину изоформы фермента инициирует сигнал, приводящий к гибели клеток.

На следующем этапе работы А.М. Тверской провел моделирование участка связывания кардиостероидов резистентной изоформы $\alpha 1$ -субъединицы фермента, в котором имеется две аминокислотные замены. Эти результаты важны, поскольку к настоящему времени имеются данные рентгеноструктурного анализа только для чувствительной изоформы. Полученные в результате моделирования данные свидетельствуют, что кардиостероиды связываются с резистентной изоформой в одном центре и при этом взаимодействуют с меньшим количеством аминокислотных остатков. Эти результаты хорошо согласуются с полученными автором экспериментальными данными.

На заключительном этапе автор описывает эксперименты, в которых автор пытается обнаружить возможных участников сигнальных каскадов, активируемых убаином в клетках эндотелия человека и крысы. При анализе довольно большого набора сигнальных каскадов, которые могут быть вовлечены в развитие клеточной гибели, установлено, что при действии убаина в клетках крыс и человека активируются различные ветви МАРкиназного пути. В клетках крыс происходит увеличение количества фосфорилированной формы ERK 1 и ERK 2, в то время как в клетках человека увеличивается количество фосфорилированной p38 MAPK. Как известно, фосфорилированная активированная киназа ERK1/2 фосфорилирует и активирует ряд факторов транскрипции, таких как CREB, а p38 MAPK фосфорилирует транскрипционный фактор AP-1.

Однако такие же изменения наблюдались в обоих типах клеток и в среде без калия, которая, как и убаин, подавляет активность Na,K-АТФазы и уменьшает градиент ионов Na^+ и K^+ . Но в среде без калия нет индукции гибели клеток, опосредованной изменением конформации фермента при связывании убаина. Таким образом, роль ионов Na^+ и K^+ в активации сигнальных систем гибели и выживания остается под вопросом. На

основании этих данных автор делает выводы, что, во-первых, экспрессия р38 MAPK происходит не за счет изменения конформации Na,K-АТФазы, а является следствием ее ингибирования, а, во-вторых, экспрессия р38 MAPK является недостаточным условием для индукции гибели клеток. Идентифицировать нижележащий сигнальный каскад, вызывающий убаин-зависимую гибель клеток эндотелия человека, по-видимому, предстоит в дальнейшем.

Далее автором сформулированы корректные выводы, которые подводят итог проведенного исследования и демонстрируют научную новизну результатов, оригинальность и ясную логику поставленных экспериментов.

Среди полученных им новых данных стоит отметить результаты по появлению цитотоксического действия убаина после экспрессии у мышей чувствительной к убаину (S) α 1-субъединицы человека; данные по активации сигнальных каскадов, в результате которых происходит гибель клеток; сравнительный анализ характера ингибирования и связывания различных кардиостероидов с резистентной и убаин чувствительной изоформами, а также данные по изменению конформации двух этих изоформ при связывании кардиостероидов.

В заключении можно сказать, что диссертационная работа А.М. Тверского написана ясно и грамотно, хорошо иллюстрирована и аккуратно оформлена. Представленные в работе результаты получены с использованием репрезентативных выборок и подвергнуты соответствующей статистической обработке, что позволяет считать их значимыми и пригодными для формирования соответствующих гипотез.

Полученные в диссертационной работе результаты экспериментальных исследований позволили автору сформулировать хорошо обоснованные научные положения и привести различные варианты объяснений наблюдаемых явлений.

Те не менее, при анализе работы появились некоторые замечания и вопросы.

1. В некоторых частях обзор литературы излишне подробен, сообщаются детали, которые представляются излишними. Например, на мой взгляд, излишние подробности приведены в разделе, описывающем катион-связывающие центры фермента.
2. Согласно полученным данным, введение устойчивой $\alpha 1R$ в клетки HUVES, содержащие чувствительную к убаину $\alpha 1S$ изоформу, настолько понижает чувствительность к убаину, что практически клетки соответствуют содержащим только $\alpha 1R$ изоформу. С чем это может быть связано? Каково соотношение между количеством собственной и экспрессируемой в клетках в результате трансфекции $\alpha 1$ субъединицы?
3. Предположение о рекрутировании белка-партнера для передачи сигнала на индукцию гибели недостаточно обсуждено.

Приведенные выше замечания и вопросы в основном имеют дискуссионный характер.

Таким образом, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 – «Биохимия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Тверской Артём Михайлович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

