

## ОТЗЫВ

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

Актуальность исследования молекулярных механизмов действия кардиотонических стероидов (КТС) - специфических ингибиторов Na,K-АТФазы – не вызывает сомнений. Согласно современным представлениям, КТС, связываясь с Na,K-АТФазой, не только ингибируют активный транспорт натрия, но и изменяют конформацию самой АТФазы, модифицируют взаимодействие фермента с белками-партнерами, запуская сигнальные каскады, приводящие к пролиферации или смерти клеток. Изучение молекулярных основ цитотоксических эффектов КТС – проблема крайне сложная, но ее решение необходимо для понимания фундаментальных представлений о действии этих соединений, что важно и для практического применения КТС - расширения списка патологий, при которых данные соединения могут быть полезны, при персонализированных подходах к лечению пациентов и др.

Цель и задачи диссертационного исследования сформулированы четко. Для достижения цели использованы самые современные биохимические, биофизические, иммунологические, молекулярно-генетические и другие методы исследования. Достаточный объем экспериментальных данных и их грамотный статистических анализ подтверждают высокую степень достоверности полученных результатов и обоснованность выводов.

Известно, что у большинства млекопитающих чувствительность Na,K-АТФазы к убаину примерно в 1000 раз выше, чем у грызунов (в первом случае - это чувствительная (*sensitive*) к действию КТС  $\alpha 1$ -изоформа ( $\alpha 1S$ ) Na,K-АТФазы, у грызунов - резистентная (*resistant*) к действию КТС  $\alpha 1$ -изоформа ( $\alpha 1R$ ) Na,K-АТФазы). В работе А.М. Тверского изучение цитотоксических эффектов КТС проведено с учетом особенностей взаимодействия этих соединений с Na,K-АТФазой, характеризующейся различной чувствительностью к убаину (на клетках, экспрессирующих  $\alpha 1S$ - или  $\alpha 1R$ -субъединицы Na,K-АТФазы). Такой подход позволил автору выявить ключевую роль  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТФазы в механизме клеточной смерти при действии КТС.

Показано, что убаин в концентрациях, полностью ингибирующих Na,K-АТФазу, вызывает смерть клеток эндотелия человека ( $\alpha 1S$ ), не влияя на жизнеспособность клеток эндотелия крысы ( $\alpha 1R$ ). При этом ингибирование Na,K-АТФазы путём инкубации клеток в среде без калия (что также полностью подавляет активность фермента) не влияет на жизнеспособность клеток эндотелия человека и эндотелия крысы. О том, что ключевую роль в выживании клеток играет наличие ( $\alpha 1R$ )-изоформы субъединицы Na,K-АТФазы показывают и эксперименты по экспрессии ( $\alpha 1S$ )-изоформы в клетках грызунов, приводящей к их гибели. Автором делается обоснованное предположение, что смерть/выживание клеток происходит не в результате увеличения соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ , а вследствие конформационных перестроек фермента и запуска сигнального каскада. Для подтверждения проведено исследование особенности взаимодействия КТС (убаина, дигоксина и маринобуфагенина) с  $\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -субъединицами Na,K-АТФазы, которое показало, что связывание разных КТС приводит к различным конформационным переходам в  $\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -субъединицах Na,K-АТФазы. В конформации E2-P (с наибольшей чувствительностью к КТС), убаин и дигоксин взаимодействуют с  $\alpha 1S$  как псевдонеобратимые ингибиторы, в то время как маринобуфагенин связывается обратимо. С  $\alpha 1R$ -субъединицей убаин, дигоксин связываются обратимо, а маринобуфагенин не связывается вообще. О разных конформационных переходах в  $\alpha 1S$ - и  $\alpha 1R$ -субъединицах Na,K-АТФазы при связывании исследуемых КТС свидетельствуют и результаты экспериментов с ограниченным трипсинолизом, а также результаты молекулярного

моделирование участка связывания Na,K-АТФазы с КТС с заменой Gln111 и Asn122 на Arg111 и Asp122.

Несомненный интерес представляют исследования влияния убаина и среды без калия на митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК), вовлеченные в регуляцию жизнеспособности клеток. Автору удалось доказать, что в клетках с разными изоформами  $\alpha$ 1субъединицы Na,K-АТФазы активируются разные МАРК: в клетках эндотелия человека ( $\alpha$ 1S) активируется p38 МАРК, а в клетках эндотелия крысы ( $\alpha$ 1R) – ERK $\frac{1}{2}$  МАРК

Данные, представленные в диссертационной работе А.М. Тверского, обсуждались на международных и всероссийских научных конференциях, на заседании кафедры биохимии биологического факультета МГУ, опубликованы в престижных Российских и международных журналах. Кроме того, проведенное исследование поддержано грантами РНФ и РФФИ, что также подчеркивает актуальность, приоритетность, и научную значимость работы.

Судя по автореферату, Тверским А.М. получены новые приоритетные фундаментальные данные, которые полностью обосновывают выводы диссертационной работы. Работа Тверского А.М. отвечает требованиям, установленным в Положении о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - "Биохимия".

Ведущий научный сотрудник  
лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» Научно-исследовательский институт психического здоровья,  
доктор биологических наук

 — Прокопьева Валентина Даниловна

08.11.2019

Россия, 634014, г. Томск, ул. Алеутская, 4.  
НИИ психического здоровья Томского НИМЦ

Тел.: , факс:

E-mail:

Подпись ведущего научного сотрудника лаборатории клинической психонейроиммунологии и нейробиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» Научно-исследовательский институт психического здоровья, д.б.н. В.Д.Прокопьевой заверяю.

Ученый секретарь  
ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» Научно-исследовательский институт психического здоровья,  
к.м.н.



Т.В. Казенных

08 ноября 2019 г.