

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Башмакова Виктора Юрьевича на тему «Биохимическая и экспрессионная регуляция путей разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования при экспериментальном диабете и светлоклеточном раке почки», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия**

**Актуальность темы исследования.** Актуальность темы кандидатской диссертации Башмакова Виктора Юрьевича «Биохимическая и экспрессионная регуляция путей разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования при экспериментальном диабете и светлоклеточном раке почки» не вызывает сомнений. По оценке Всемирной организации здравоохранения в 2014 году уровень заболеваемости диабетом составил 9% среди взрослого населения 18 лет и старше, а к 2030 году он станет седьмой по значимости причиной смерти. Известно, что важную роль в развитии диабета и его осложнений важную роль играет окислительный стресс. Поэтому особый интерес представляет изучения факторов транскрипции и других механизмов, активируемых окислительным стрессом, которые влияют на дифференциальную экспрессию РНК при диабете. С другой стороны, в состоянии непрерывного и интенсивного образования АФК степень окислительного повреждения ДНК становится более значительной, что ведет к возникновению геномной нестабильности и увеличивает риск развития опухолей, еще одной группы социально значимых заболеваний. При этом не оставляет сомнения факт, что ключевую роль в развитии диабета и онкозаболеваний играет ЭТЦ митохондрий, являясь главным источником АФК в клетке. Диагностика социально значимых заболеваний является одной из приоритетных задач многих систем здравоохранения в мире. Поэтому выявление общих закономерностей в развитии таких актуальных заболеваний как диабет и онкологические заболевания и новых информативных биомаркеров ранних биологических эффектов, к которым относится окислительный стресс, является одной из важнейших и актуальнейших задач современной биологической науки.

**Научная новизна диссертационной работы.** Автором проведён полнотранскриптомный анализ экспрессии генов у пациентов с гистологически подтверждённым светлоклеточным раком почки на российской популяции.

В ходе исследований убедительно показано, что при светлоклеточном раке почти происходит подавление экспрессии дыхательных путей, что ведёт к нарушениям функционального состояния митохондрий и почек в целом.

Автором проведено изучение влияния перспективного антиоксиданта SkQ1 на развитие экспериментального диабета I типа. Обнаружено, что он снижает уровень экспрессии маркерных генов до уровня интактных животных и обладает протекторными свойствами на изолированных митохондриях.

Диссертантом произведён обстоятельный анализ полученных данных и выявлены общие закономерности развития экспериментального диабета I типа и светлоклеточной почечно-клеточной карциномы, в основе которых лежат существенные нарушения окислительного метаболизма.

**Теоретическая и практическая значимость.** Общеизвестным является мнение о том, что окислительный стресс лежит в основе патогенеза множества разнообразных заболеваний. Поэтому изучение его молекулярно-генетических и физиолого-биохимических основ позволяет выявлять системные взаимосвязи, способствуя совершенствованию существующих и созданию принципиально новых методов диагностики и терапии социально значимых заболеваний. В связи с тем, что более половины всех случаев онкологических заболеваний диагностируется на поздних стадиях, особую актуальность приобретает выявление информативных биомаркеров ранних патологических состояний, к числу которых относится и окислительный стресс. Полученные Виктором Юрьевичем данные о протекторной роли антиоксиданта SkQ1 при диабете 1 типа будут способствовать росту интереса к дальнейшей разработке и клиническим испытаниям фармакологических препаратов, производимых на основе SkQ1.

Материалы рассматриваемой диссертационной работы используются в учебном процессе на биолого-почвенном факультете Воронежского госуниверситета при чтении лекций, спецкурсов и для проведения лабораторных практикумов.

**Апробация материалов диссертации.** Результаты, полученные автором в ходе выполнения диссертационной работы, неоднократно докладывались и обсуждались на различных международных, региональных и университетских конференциях. В частности, они были представлены на 3-й Всероссийской конференции молодых учёных-медиков (Воронеж, 2009), 1-й международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010), 22-й международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов–2015» (Москва, 2015).

**Публикации.** Материалы диссертации опубликованы в 18 печатных работах, в том числе в 4 изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и полностью отражают основные результаты исследований.

**Оценка содержания диссертации.** Диссертационная работа оформлена в соответствии с действующими требованиями ВАК к написанию диссертационных работ, изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и иллюстрирована 21 рисунком. Диссертационная работа Башмакова В.Ю. имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы (187 источников, из них 187 - на иностранном языке) и приложения.

В разделе «Введение» автором дано обоснование актуальности выбранной темы, приведены цель и задачи исследования, отражена научная новизна, теоретическая и практическая значимость выполненной работы.

В разделе «Обзор литературы» Виктор Юрьевич приводит тщательный анализ современных данных, касающихся роли митохондрий в возникновении и развитии окислительного стресса, рассматривает молекулярные механизмы, лежащие в основе разнообразных патологических состояний организма, являющихся следствием митохондриальных дисфункций. Особое внимание уделено рассмотрению молекулярно-генетических и биохимических основ возникновения диабета и онкологических заболеваний.

В разделе «Объекты и методы исследования» автором представлена общая схема и объём проведённых исследований. Для выполнения цели и задач диссертационной работы Виктор Юрьевич использовал широкий спектр современных методов физико-химической и молекулярной биологии: количественный ПЦР-анализ, спектрофотометрирование, центрифугирование, полярографию, электрофоретические исследования и методы компьютерной биологии. Особо следует отметить проведение полнотранскриптомного анализа экспрессии с использованием платформы Affymetrix GeneAtlas, что позволило автору разработать схему метаболической регуляции при светлоклеточном ПКР, обусловленной активатором транскрипции PGC-1 $\alpha$ . Применение автором методов вариационной статистики при обработке результатов исследований позволяет говорить о достоверности и воспроизводимости полученных данных.

В разделе «Дифференциальная экспрессия генов поджелудочной железы» автором приводятся результаты полнотранскриптомного анализа экспрессии генов в клетках тканей поджелудочной железы крыс с экспериментальным диабетом I типа. При этом установлено, что в наибольшей степени отрицательно регулированными оказались гены белков-переносчиков (Nag11 – ген, кодирующий Na<sup>+</sup>-зависимый переносчик глюкозы, вовлеченный в реабсорбцию глюкозы), путей метаболизма углеводов (G6pc, Fbp21 (глюконеогенез), Gba3, Aldob), аминокислот (Dao, Pah). В тоже время, наибольшим уровнем экспрессии характеризовался ген Car3, кодирующий фермент карбоангидразу 3, который катализирует реакцию гидратации диоксида углерода и может принимать участие в клеточном ответе на окислительный стресс. Уровень его экспрессии возрастал почти в 239 раз.

Раздел «Экспрессия генов белков-компонентов системы защиты от АФК в клетках поджелудочной железы крыс» посвящён выборочному анализу результатов микрочиповых исследований с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Виктором Юрьевичем было установлено, что экспрессия почти всех выбранных им генов-мишеней снижается в условиях окислительного стресса при диабете. Так, экспрессия Cat при диабете ниже контрольного значения (здоровые животные) в 5,57 раз, Gsr – в 4,2 раза, Gsta3 – в 1,9 раз, Gstt и Hsp90aa1 – в 3,1 раза, Prdx3 – в 2,98 раз, Sod2 – в 4 раза. При этом было отмечено статистически достоверное возрастание экспрессии гена индуцибельной NO-синтазы Nos2 в 8,8 раза, что

автор объясняет цитокин-зависимой природой индуцибельности фермента, а также особенностями действия аллоксана, токсический эффект которого включает генерацию активных форм азота.

Следующий раздел диссертационной работы содержит результаты по изучению влияния SkQ1 на экспрессию генов окислительного метаболизма. Проведённый автором анализ экспрессионной регуляции механизмов свободного окисления и защиты от АФК в комплексе с изучением характера развития гипергликемии в ответ на пре-терапию митохондриально-направленным антиоксидантом позволил продемонстрировать протекторный эффект SkQ1 на клетки поджелудочной железы крысы в условиях аллоксанового диабета. Подобный эффект, по мнению автора, может быть объяснен усилением антиоксидантного статуса  $\beta$ -клеток и противодействием токсическому влиянию аллоксана.

В разделе «Эксперименты на изолированных митохондриях» автором приводятся результаты изучения респираторных характеристик изолированных митохондрий печени крыс с экспериментальным диабетом в условиях предварительной терапии SkQ1. В результате серии экспериментов было установлено, что ингибирования дыхательной цепи не происходит несмотря на гипергликемию. Наблюдавшееся повышение скоростей дыхания в состояниях 4' и 3 по Чансу на 72% и 23% соответственно позволило автору сделать вывод о том, что в присутствии SkQ1 в клетке происходит сброс мембранного потенциала – «мягкое» разобщение, защищающее клетку от пагубного воздействия аллоксана (АФК). Кроме того, было установлено, что при приёме животными препарата, содержащего антиоксидант SkQ1, наблюдается снижение скорости образования АФК в 0,6-0,3 раза, что говорит об эффективности препарата. В случае, когда крысы принимали препарат с антиоксидантом, а затем вводился аллоксан, наблюдается снижение уровня скорости генерации перекиси водорода до уровня контроля, что так же является подтверждением антиоксидантных свойств препарата, содержащего SkQ1.

Раздел «Снижение уровня генной экспрессии окислительных метаболических путей при светлоклеточном раке почки» содержит обширные результаты изучения дифференциальной экспрессии генов в опухоли при светлоклеточном раке почки. Автором было установлено, что экспрессия 1140 генов в опухолевых тканях была изменена более чем в 3 раза с уровнем значимости  $p < 0.05$  с поправкой на среднюю долю ложных отклонений. Проведённый с помощью IPA (Ingenuity Pathway Analysis) анализ массива полученных данных выявил следующие канонические пути как наиболее значимые: «окислительное фосфорилирование» ( $-\log(p)=9,467$ ; содержащий 93 гена, 88 из которых характеризуются сниженной экспрессией (down-регуляция)), «митохондриальная дисфункция» ( $-\log(p)=8,58$ ; 147 генов, 126 из которых имеют пониженный уровень экспрессии), метаболизм аминокислот объединил пути «деградация валина» ( $-\log(p)=7,178$ ; 17 генов, 16 down-регулированы) и «деградация триптофана» ( $-\log(p)=5,91$ , 14 генов, 12 down-регулированы); «цикл трикарбоновых кислот» ( $-\log(p)=5,778$ ; 23

гена, 22 down-регулируемы), «β-окисление жирных кислот» ( $-\log(p)=4,88$ ; 26 из 28 генов down-регулируемы). На основании данных дифференциальной экспрессии генов Виктором Юрьевичем построена схема регуляторных взаимодействий, отражающая функциональную нагрузку PGC-1α при светлоклеточном ПКР и демонстрирующая взаимодействие между регуляторами и факторами транскрипции.

В заключении автор обобщает полученные им результаты и говорит о том, что результаты анализа активности метаболических путей, обусловленной дифференциальной экспрессией генов, позволили выявить центральную роль митохондриального метаболизма при скПКР. Полученные В.Ю. Башмаковым результаты исследования регуляции процессов окислительного фосфорилирования при экспериментальном диабете и светлоклеточной почечно-клеточной карциноме выявили общие закономерности развития этих патологий и позволили составить гипотетическую схему регуляции окислительного фосфорилирования при раке почек на примере выборки представителей российской популяции.

Выводы полностью отражают исследования диссертанта, сформулированы на основании полученных им результатов, достаточно аргументированы и объективны.

Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации, включая выводы. Диссертация написана хорошим литературным языком, представленный фактический материал легко воспринимается.

В целом выполненная диссертационная работа заслуживает высокой оценки. Вместе с тем, при анализе диссертации возникает ряд вопросов и замечаний, наиболее существенными из которых являются следующие:

1. Каким образом проводилось подтверждение диагноза экспериментального диабета I типа? Только с учётом уровня глюкозы в крови животных?
2. Каков, по мнению автора, возможный механизм подавления экспрессии генов ферментов антиоксидантной защиты в условиях экспериментального диабета I типа у крыс?
3. Не совсем понятно, почему при изучении протекторного действия SkQ1 в аллоксановой модели диабета I типа, автором не были изучены уровни экспрессии генов белков-компонентов системы антиоксидантной защиты и генов NO-синтаз.
4. К сожалению, автором не проводились патоморфологические исследования поджелудочной железы крыс, что позволило бы получить более полную картину патогенеза аллоксанового диабета.
5. Возможно ли применение SkQ1 для терапии заболеваний, отличных от диабета I типа?

Вместе с тем, указанные недостатки не оказывают существенного влияния на восприятие, целостность и ценность представленной В.Ю. Башмаковым работы, и не снижают положительной оценки диссертации.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Башмакова Виктора Юрьевича " Биохимическая и экспрессионная регуляция путей разобщения дыхания и окислительного фосфорилирования при экспериментальном диабете и светлоклеточном раке почки" является законченным научным исследованием, полностью отвечающим требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункт 9 "Положения о порядке присуждения учёных степеней"), а её автор вполне заслуживает присвоения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.


20 января 2016 г.

Кандидат биологических наук,  
заведующий лабораторией  
патобиохимии ГНУ Всероссийский  
научно-исследовательский  
ветеринарный институт патологии,  
фармакологии и терапии  
Россельхозакадемии  
394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова,  
д. 114Б.

Тел.: 8 (473) 253-65-94

e-mail: fomenych@rambler.ru

Подпись Фоменко О.Ю. заверяю:  
учёный секретарь ГНУ  
ВНИВИПФиТ Россельхозакадемии,  
к.б.н., доцент

 Фоменко Олег Юрьевич



Ермакова Т.И.