

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук
Белослудцева Константина Николаевича на диссертационную работу
Гуреева Артема Петровича на тему: «Модуляция метаболизма активных форм кислорода и биогенеза митохондрий мозга при старении мышечной ткани», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Актуальность темы исследования. Старение организма является, вероятно, одним из самых изучаемых этапов онтогенеза. Связано это с тем, что именно к этому периоду накапливаются различные повреждения внутриклеточных структур, которые не позволяют клетке и организму в достаточной степени восстанавливаться и приводят к драматическим последствиям. Поэтому исследования механизмов старения, а также поиск фармакологических соединений, способных корректировать этот процесс, вряд ли потеряют свою актуальность и значимость в ближайшее время.

Общепризнанно, что при старении наблюдается дисфункция митохондрий. Особенно это актуально в тканях с высоким уровнем потребления энергии, к которым можно отнести головной мозг. Дисфункция митохондрий в мозге при старении является одной из причин таких социально-значимых заболеваний как болезни Альцгеймера и Паркинсона. В качестве причин дисфункции митохондрий рассматривают развитие окислительного стресса, нарушение митохондриального биогенеза и усиленная митофагия. Все это приводит к нарушению процесса окислительного фосфорилирования, дефициту АТФ и дополнительной гиперпродукции активных форм кислорода. Во многих лабораториях мира ведется выяснение механизмов регуляции данных процессов при старении и возможных способов компенсации дисфункции митохондрий. Работа Гуреева А.П. как раз посвящена решению подобных проблем. В своей диссертации Артем Петрович попытался систематизировать данные о механизмах дестабилизации митохондриального биогенеза в мозге при старении и оценить терапевтический потенциал соединений, способных модулировать различные пути митохондриального и клеточного метаболизма.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации. Диссертация Гуреева А.П. включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 192 страницах, содержит 46 рисунков и 13 таблиц. В списке процитированной литературы 394 источника.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность изучаемой темы, формирует цель и задачи работы, характеризует научную новизну, практическую значимость результатов

исследования, определяет научные положения, выносимые на защиту, приводит данные о публикациях и апробации работы на конференциях.

В разделе «Обзор литературы» автор представил достаточно современный взгляд на изучаемую проблему. Рассмотрены вопросы о роли митохондриального биогенеза в клеточной физиологии и процессах старения, регуляции митохондриального биогенеза через сигнальные каскады PGC-1 α и Nrf2/ARE, взаимодействие этих двух сигнальных путей. Отдельно охарактеризованы изменения митохондриального биогенеза при нейродегенеративных заболеваниях.

В разделе «Материалы и методы исследования» автор приводит описание всех методик и схем, используемых в работе. Важно отметить, что в работе используется широкий спектр методов биохимии, биофизики, молекулярной биологии, физиологии, которые позволяют достаточно полно и подробно ответить на поставленные в исследовании задачи. Можно сказать, что работа проведена на высоком методическом уровне.

Собственно результаты исследования изложены в 7 главах. Первая глава посвящена характеристике возрастных изменений биогенеза митохондрий в мозге мышей. Автор показывает, что у 15-месячных мышей наблюдается снижение количества митохондрий (оцененное по количеству митохондриальной ДНК и активности цитратсинтазы) по сравнению с 7-месячными мышами. Параллельно с этим, наблюдается снижение уровня экспрессии генов, кодирующих белки, ответственных за митохондриальный биогенез и сигнальный каскад Nrf2/ARE. Автор делает заключение о том, что именно возрастные нарушения функционирования Nrf2/ARE сигнального каскада связаны с возрастными изменениями интенсивности митохондриального биогенеза. Параллельно с этим автор характеризует физиологические и поведенческие параметры у исследуемых групп мышей. Делается заключение, что поведенческие отклонения у мышей в возрасте 15 месяцев могут быть связаны с нарушением митохондриального биогенеза и дисфункцией митохондрий.

Следующая глава результатов исследования посвящена изучению влияния метиленового синего на биогенез и функционирование митохондрий мозга мышей. Показано, что в микромолярных концентрациях метиленовый синий индуцирует генерацию перекиси водорода митохондриями мозга мышей. На основании полученных данных автор предложил новый механизм транспорта электронов в митохондриях с участием метиленового синего. Также показано, что пероральная терапия 15-месячных мышей метиленовым синим в течение 60 дней приводила к положительным изменениям в поведенческих реакциях животных, а также увеличению митохондриального биогенеза и

усилению экспрессии генов белков, участвующих в антиоксидантной защите. Сделан вывод о том, что мягкий окислительный стресс, индуцированный продукцией H_2O_2 , вызываемый метиленовым синим, запускает цепь компенсаторных реакций, которые в итоге приводят к активации митохондриального биогенеза и антиоксидантной защиты через Nrf2/ARE-сигнальный путь.

Следующая глава описывает результаты исследования по влиянию β -гуанидинопропионовой кислоты на митохондриальный биогенез. Данное соединение является конкурентным ингибитором поглощения креатина. Показана тенденция к увеличению исследовательского поведения у животных, которым вводили β -гуанидинопропионовую кислоту. Показано, что введение животным β -гуанидинопропионовой кислоты, приводило к стимуляции митохондриального биогенеза через Nrf2/ARE-сигнальный путь.

В четвертой главе результатов описываются данные о влиянии фенофибрата (синтетический лиганд PPAR α) на метаболизм жирных кислот и биогенез митохондрий. Сделан вывод об антидепрессантных свойствах фенофибрата. Продемонстрировано общее улучшение митохондриального метаболизма, проявляющееся в увеличении пероксисомального и митохондриального окисления жирных кислот. Вместе с тем, данные процессы не были ассоциированы с увеличением митохондриального биогенеза и активацией Nrf2/ARE-сигнального пути.

Последняя глава результатов имеет не только исследовательский, но и методический характер, и описывает измерение количества окислительных повреждений митохондриальной ДНК в присутствии исследуемых соединений. В данной главе автор оптимизирует метод определения количества повреждений в митохондриальной ДНК. После этого было продемонстрировано, что метиленовый синий и β -гуанидинопропионовая кислота в используемых в работе концентрациях не являются генотоксичным соединением. Вместе с тем фенофибрат способен вызывать повреждение митохондриальной ДНК.

Результаты исследования проиллюстрированы рисунками и таблицами. Полученные результаты диссертационного исследования подвергнуты обсуждению с аргументированной интерпретацией данных современной литературы по рассматриваемой проблеме.

Раздел «Заключение» обобщает полученные в работе результаты. Выводы оригинальны и соответствуют полученным результатам.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения.
Степень достоверности полученных Гуреевым А.П. результатов подтверждается

множественностью и воспроизводимостью полученных данных. В работе использовались современные методы исследования. Также о достоверности полученных данных свидетельствует то, что они были опубликованы в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах. Таким образом, достоверностью результатов, положений и заключения не вызывает сомнений.

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования.

Полученные при выполнении диссертационной работы Гуреевым А.П. данные имеют научную и практическую значимость. В настоящей работе было установлено, что возрастные изменения количества и качества митохондрий мозга связаны с подавлением Nrf2-зависимого биогенеза. Впервые продемонстрирован опосредованный метиленовым синим транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий. Охарактеризованы механизмы действия метиленового синего, β -гуанидинопропионовой кислоты и фенофибрата на нарушение митохондриального биогенеза при старении. В работе был значительно модифицирован метод ПЦР длинных фрагментов для определения количества повреждений мтДНК мышечной ткани.

Пожелания, вопросы и замечания.

Давая в целом положительную оценку полученным результатам и сделанным выводам, хотел бы остановиться на некоторых моментах, которые вызывают вопросы и замечания.

1. В работе автор, основываясь на данных по экспрессии генов, делает выводы об участии тех или иных белковых сигнальных каскадов в регуляции процессов митохондриального биогенеза, окислительного стресса и т.д. Несмотря на то, что этот подход применяется, стоит отметить, что количество мРНК не является прямым методом оценки уровня белков. Такая оценка может иногда давать искаженную информацию о количестве белков. Хотелось бы, чтобы автор в интересующих его процессах оценивал количество, по крайней мере, основных белков методом иммуноблоттинга.

2. В работе говорится о том, что метиленовый синий индуцирует мягкий окислительный стресс, в результате чего запускается активация Nrf2/ARE-сигнального пути и синтез антиоксидантных ферментов, что приводит к положительным компенсаторным эффектам в организме стареющих мышечных тканей. При этом автор не измерил ни количество, ни активность антиоксидантных ферментов. Стоит отметить, что в используемых концентрациях метиленовый синий индуцировал значительное (практически трехкратное) увеличение продукции перекиси водорода митохондриями в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (рис. 20 и 42). Во многих исследованиях подобное увеличение в продукции активных форм кислорода рассматривается как достаточно

патологический процесс. Хотелось бы узнать в какой момент, по мнению автора, мягкий окислительный стресс перестает быть таковым. Кроме того, стоит обратить внимание, что несмотря на то, что авторы не обнаружили токсический эффект при пероральном введении метиленового синего на ткани мозга, можно предположить, что такой эффект будет наблюдаться в печени, как основном органе детоксикации ксенобиотиков. Поэтому заявление, что «метиленовый синий не является генотоксичным соединением» достаточно преждевременно.

3. На странице 83 автор пишет: «... в возрасте 15 месяцев мыши начинают демонстрировать некоторые поведенческие отклонения, связанные со снижением физической силы и выносливости, подавлением исследовательского поведения. Частично эти изменения могут быть детерминированы снижением уровня АТФ из-за снижения количества митохондрий, связанного с дисфункцией процесса митохондриального биогенеза». Это достаточно спекулятивное заявление. Или страница 93: «Увеличение скорости дыхания животных на 15% может быть вызвано непосредственно альтернативным транспортом электронов, который обеспечивает МС при поступлении в митохондрии». Но тут же пишет, что метиленовый синий активирует комплекс 4 дыхательной цепи. Так в чем же собственно дело? Страница 120: «На основании этих данных можно предположить, что увеличение активности митохондриального β -окисления приводит к усилению нагрузки на ЭТЦ митохондрий, и это может быть причиной увеличенной продукции АФК». Хотелось бы, чтобы автор объяснил эти моменты.

4. Автор небрежно подошел к изложению диссертации. Читателю во многих местах остается только догадываться, какие концентрации соединений были использованы в работе (например, в методах не указана концентрация инъекции ротенона при исследовании нейропротекторных свойств метиленового синего (с. 63-64) или концентрации ротенона и антимицина (рис. 13)). Есть ошибки/опечатки в представлении концентраций компонентов сред и в характеристике некоторых процессов. Например, на странице 88 сказано: «... МС способен окисляться NADH и FADH₂ до МС-Н₂ и восстанавливаться цитхромом с и молекулярным кислородом с образованием H₂O₂ [123]». Но ведь все должно происходить все наоборот. МС должен восстанавливаться NADH и FADH₂ и окисляться цитохромом и кислородом. Регулярно встречаются в соседних предложениях или абзацах одни и те же вводные слова (например, страницы 44, 46, 49). Все это немного портит впечатление от в целом достойной работы.

Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа А.П. Гуреева в целом заслуживает высокой положительной оценки. Критические комментарии вызваны интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям.

Таким образом, следует признать, что диссертационная работа А.П. Гуреева, вне всякого сомнения, выполнена на актуальную тему на современном методическом уровне, содержит новые серьезные научные результаты, имеющие важное значение для развития современной биохимии, биофизики, клеточной биологии и биотехнологии. Содержание автореферата и опубликованных статей полностью отражает содержание диссертации. Считаю, что диссертационная работа Артема Петровича Гуреева на тему «Модуляция метаболизма активных форм кислорода и биогенеза митохондрий мозга при старении мышей» полностью соответствует требованиям, изложенным в п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент

Профессор кафедры биохимии,
клеточной биологии и микробиологии
ФГБОУ ВО «Марийский
государственный университет»

доктор биологических наук
Белослудцев
Константин Николаевич



Адрес: 424000, Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 1, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет»
Телефон: (8362)68-80-02
Сайт: www.marsu.ru
e-mail: bekonik@gmail.com