

УТВЕРЖДАЮ

Проректор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».



*А.А. Федянин*  
А.А. Федянин

*9 декабря* 2019 г.

## ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе Гуреева А.П. «Модуляция метаболизма активных форм кислорода и биогенеза митохондрий мозга при старении мышечной ткани», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

### Структура и объем работы

Структура представленной диссертационной работы стандартна и состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части и обсуждения результатов (2 - 7 главы), заключения, выводов и списка литературы (394 источника). Иллюстративный материал включает 46 рисунков и 13 таблиц.

Обзор литературы содержит тщательный анализ современных литературных данных, полно освещающий вопросы, касающиеся роли митохондриального биогенеза в функционировании организма. Подробно описаны механизмы регуляции митохондриального метаболизма и биогенеза через PGC-1 $\alpha$  и Nrf2/ARE-сигнальные каскады. Описаны способы регуляции данных транскрипционных факторов на уровне транскрипции и их посттрансляционные модификации. Хочется отметить, что в обзоре

литературы есть анализ информации, касающейся взаиморегуляции PGC-1 $\alpha$  и Nrf2/ARE-сигнальных каскадов, а также обсуждается их роль в старении и возрастных нейродегенеративных заболеваниях.

Автором используются современные биохимические и молекулярно-биологические методы, а также классические методы оценки поведенческих особенностей мышей. Схемы эксперимента и методы описаны достаточно подробно, поэтому они могут быть легко воспроизведены. Работа выполнена в соответствии с правилами, установленными Комитетом по уходу и использованию животных Воронежского государственного университета, которые соответствуют директиве, установленной Европейским Союзом 2010/63/EU в отношении экспериментов с использованием животных. Экспериментальная часть работы (главы 3 - 7) выполнена на высоком научно-методическом уровне. Структура глав схожа и логично вытекает из целей и задач исследования.

Сначала автор описывает изменения митохондриального биогенеза в мозге 15-месячных мышей в сравнении с 7-месячными мышами. Было выявлено, что снижается функциональность Nrf2/ARE сигнального пути, что приводит не только к сокращению количества копий митохондрий, но и к некоторым поведенческим дисфункциям, которые, по предположению автора, могут быть связаны с нарушениями митохондриального биогенеза в мозге.

Следующие три раздела диссертации посвящены вопросу фармакологической модуляции митохондриального биогенеза тремя разными веществами, которые в той или иной степени могут вызывать компенсаторные эффекты. Первым из этих веществ является метиленовый синий, который может осуществлять в митохондриях альтернативный транспорт электронов. Ранее предполагалось, что данный процесс связан с антиоксидантными свойствами метиленового синего. Однако автор показал, что в изолированных митохондриях метиленовый синий напротив вызывает увеличение скорости продукции перекиси водорода.

Кроме того, было выявлено, что метиленовый синий шунтирует I комплекс не с цитохромом с, как долгое время предполагалось ранее, а с III комплексом. Данное предположение подкрепляется результатами измерения мембранного потенциала, скорости дыхания митохондрий и скорости продукции перекиси водорода. Между тем, автор предполагает, что увеличение продукции активных форм кислорода, в частности пероксида, может вызывать мягкий окислительный стресс, который запускает компенсаторные реакции в мозге 15-месячных мышей за счет активации Nrf2/ARE сигнального пути. Это приводит к увеличению экспрессии антиоксидантных генов и генов, регулирующих митохондриальный биогенез, что положительно сказывается на некоторых поведенческих параметрах мышей.

Следом автор описывает влияние бета-гуанидинпропионовой кислоты на митохондриальный биогенез. Здесь также была отмечена роль Nrf2/ARE сигнального пути, в то время как экспрессия PGG-1α и генов, регулируемых им, не изменялась. Автор связывает это с тем, что в мозге роль Nrf2 в митохондриальном биогенезе выше, чем роль PGG-1α. Стоит отметить, что данные результаты отчасти подтверждаются и исследованием, описанным в следующей части. Фенофибрат, который является синтетически лигандом рецепторов PPARα (PGG-1α является коактиватором PPARα), не вызывал увеличение интенсивности митохондриального биогенеза в мозге, но положительно регулировал метаболизм жирных кислот. Автор это связывает с тем, что PGG-1α является скорее индуктором жирового метаболизма, а регуляция митохондриального биогенеза, по крайней мере в мозге, не его основная функция. Роль Nrf2 в митохондриальном биогенезе автором описывается достаточно подробно.

В заключительной главе описывается метод определения количества повреждений мтДНК с помощью ПЦР длинных фрагментов. Автор адаптировал данный момент под Encyclo-полимеразу и митохондриальный ген мышца. Были выявлены достаточно интересные закономерности в распределении количества окислительных повреждений по всей цепи мтДНК

мышцы. Было показано, что мягкий окислительный стресс, индуцируемый метиленовым синим, и энергетический стресс, индуцируемый бета-гуанидинпропионовой кислотой, не вызывает окислительных повреждений. В тоже время, стимуляция жирового метаболизма в печени, напротив, ассоциирована с определенными патологическими изменениями.

Все выводы, которые сформулированы автором, достоверны и логично следуют из полученных им результатов.

### **Актуальность темы выполненной работы**

Несмотря на очень быстрое развитие биомедицинских наук, на данный момент не было разработано эффективных медикаментозных методов лечения нейродегенеративных заболеваний. Очевидно, что одним из ключевых факторов их развития является возрастное нарушение функционирования митохондрий, что приводит к дефициту АТФ и гиперпродукции АФК в головном мозге.

Фармакологическая модуляция митохондриального биогенеза представляется более перспективным направлением в лечении нейродегенеративных заболеваний, так как может одновременно увеличивать количество митохондрий и активность электрон-транспортной цепи митохондрий. Поиск путей фармакологической регуляции митохондриального биогенеза является относительно молодым направлением в биомедицине, которое может позволить разработать пути предупреждения развития данных патологий, а также способствовать активному долголетию.

На данный момент существует еще много нерешенных вопросов в области исследования митохондриального биогенеза. В частности, плохо изучен такой фундаментальный вопрос как взаимодействие PGC-1 $\alpha$  и Nrf2. Ранее большая часть исследователей специализировалась на изучении какого-либо одного из этих сигнальных путей. Данная работы одна из немногих направлена на изучение взаиморегуляции PGC-1 $\alpha$  и Nrf2. Все это подтверждает актуальность данной темы.

## Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, для науки и практики

Автором было показано, что возрастное снижение количества копий митохондрий в мозге может быть связано с подавлением Nrf2-зависимого биогенеза. Преимущество данного исследования заключается в том, что для экспериментальной проверки метиленового синего,  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты и фенофибрата использовались 15-месячные мыши – возраст, который наиболее уязвим для факторов, приводящих к митохондриальным дисфункциям и началу развития нейродегенеративных заболеваний.

Автор показал, что восстановленная форма метиленового синего передает электроны, предположительно, на III комплекс электрон-транспортной цепи митохондрий, а не на цитохром с, как считалось ранее. При этом данный процесс связан с увеличением скорости продукции  $H_2O_2$ , а не механическим скавенджером АФК, как предполагалось ранее несколькими исследовательскими группами. Антиоксидантный эффект метиленового синего достигается за счет положительной регуляции экспрессии генов *Ho-1*, *Sod2*, *Prdx3*. Кроме того, было показано, что метиленовый синий именно через Nrf2/ARE-сигнальный путь увеличивает интенсивность митохондриального биогенеза.

Автор продемонстрировал, что снижение уровня креатина за счет его конкурентного ингибирования  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислотой также может активировать митохондриальный биогенез в мозге 15-месячных мышей. В эксперименте данный эффект достигался за счет активирования оси AMPK/Nrf2/ARE, но не AMPK/PGC-1 $\alpha$ , как предполагалось ранее. Автором были выявлены различия в метаболизме  $\beta$ -гуанидинопропионовой кислоты в среднем мозге и коре больших полушарий, что, по мнению автора, вызвано различиями в транспорте гуанидиновых соединений через гематоэнцефалический барьер в разных отделах мозга. При этом возрастание интенсивности липидного метаболизма за счет употребления фенофибрата не увеличивало количество митохондрий ни в мозге, ни в печени.

Автором был значительно модифицирован метод ПЦР длинных фрагментов для определения количества повреждений мтДНК мышей. Была подобрана панель праймеров с учетом наличия в ядре псевдогенов, а также с расчетом степени эффективности и линейности амплификации целевых фрагментов. Был показан гетерогенный характер повреждений, который зависит от количества GTGR-последовательностей, содержащих  $Fe^{2+}$ , необходимых для превращения  $H_2O_2$  в  $\bullet OH$ , который и вызывает основные окислительные повреждения.

Научная обоснованность результатов диссертационного исследования аргументирована большим количеством фактического материала. Высокой степенью новизны обладают не только полученные результаты, но и методы исследования. Решение такой важной фундаментальной задачи, как регуляция митохондриального биогенеза в мозге, безусловно, сможет найти практическое применение, так как в будущем возможно разработка лекарственных препаратов, которые могут тормозить процесс возрастной дегенерации мозга, что поможет замедлить патогенез нейродегенеративных заболеваний.

По результатам работы опубликовано 9 статей в журналах, которые индексируются в WebofScience, Scopus и ВАК. Результаты были представлены на представительных международных конференциях. Публикации и автореферат в полной мере отражают содержание диссертации.

### **Замечания по диссертации**

В целом диссертационная работа оставляет очень хорошее впечатление. Принципиальных замечаний к работе Гуреева А.П. нет. Научная значимость, достоверность и обоснованность результатов, представленных диссертантом, не вызывают сомнений.

Вместе с тем, на наш взгляд, интересная экспериментальная работа, выполненная диссертантом, вынуждает поставить перед автором ряд

вопросов, которые, несомненно, носят полемический характер и подчеркивают актуальность выполненной диссертации:

1. Было бы интересно оценить влияние изучаемых соединений на активность антиоксидантных ферментов.
2. В исследовании изучается количество копий митохондрий, поэтому было бы интересно оценить изменения количества копий митохондрий с помощью электронной микроскопии.
3. Исследование проводилось на мышах возрастом 15 месяцев, и они позиционируются как «старые» мыши. Однако имеются исследования, которые проводились на мышах возрастом 24 месяца. Поэтому было бы интересно расширить исследование за счет добавления еще одной возрастной группы.

Сделанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей положительной оценки.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты проведенного исследования могут выступать в качестве основы для разработки новых подходов к замедлению старения и патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Разработанный метод детекции окислительных повреждений мтДНК может использоваться для токсикологических исследований фармакологических препаратов, которые так или иначе влияют на оксидативный статус организма. Разработанная методология детекции количества повреждений мтДНК может быть внедрена в учебный процесс Воронежского государственного университета.

#### **Заключение**

На основании всего вышеизложенного можно сделать заключение, что диссертация А.П. Гуреева «Модуляция метаболизма активных форм кислорода и биогенеза митохондрий мозга при старении мышей» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи по исследованию

митохондриального биогенеза в мозге у стареющих мышей. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.04 - Биохимия и полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а ее автор, Гуреев Артем Петрович, достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории фотохимии биомембран научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова  
«14» ноября 2019 г. (протокол № 1 )

Заведующий лабораторией фотохимии биомембран

научно-исследовательского института  
физико-химической биологии имени  
А.Н. Белозерского МГУ имени М.В.  
Ломоносова доктор биологических  
наук

Российская Федерация, 119991,  
г. Москва, Ленинский горы, д. 1, стр.  
40  
тел. +7-495-9393107, e-mail  
severin@belozersky.msu.ru

Ф.Ф. Северин

