

119121, гор. Москва, ул. Погодинская, 10, стр.8

тел.: (+7/499) 246-69-80, (+7/499) 246-34-66, факс: (+7/499) 245-08-57, эл. почта: inst@ibmc.msk.ru, http://www.ibmc.msk.ru  
ОКПО 01897373, ОГРН 1027739053792, ИНН/КПП 7704084419 / 770401001, ОКАТО 45286590000

№ 463

« 18 ОКТ 2018 » 2018 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИБМХ

доктор биол. наук, академик РАН

А.В. Лисица

2018 год



### ОТЗЫВ

ведущей организации - Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) о диссертационной работе М.А. Тюменцева на тему «Анализ вклада дисфункции митохондрий в развитие признаков болезни Альцгеймера у крыс OXYS», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

#### Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа М.А. Тюменцева посвящена исследованию механизмов патогенеза болезни Альцгеймера (БА) – одного из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний человека. Заболеваемость БА резко увеличивается с возрастом – её частота приблизительно удваивается каждые пять лет, начиная с возраста 65 лет. Сегодня количество пациентов с БА в индустриально развитых странах превышает 30 млн. человек, а к 2050 году может составить более 50 млн. человек в связи с увеличением средней продолжительности жизни и, как следствие, старением населения. БА приводит к деменции и неизбежной смерти пациента (продолжительность жизни после постановки диагноза БА составляет 3-9 лет). Несмотря на продолжающиеся не одно десятилетие интенсивные работы по поиску средств лечения и/или профилактики БА, до настоящего времени они так и не найдены, что во многом определяется недостаточностью текущих знаний о молекулярно-клеточных механизмах патогенеза этого заболевания. Согласно доминирующей теории патогенеза БА, известной как «гипотеза амилоидного каскада», центральным событием является появление и накопление пептида амилоида-бета (Абета) в нейротоксической форме – в виде олигомеров и/или агрегатов пептида, что запускает цепь молекулярных событий, приводящих к образованию амилоидных бляшек в паренхиме головного мозга, гиперфосфорилированию тау-белка и формированию нейрофибриллярных клубков. Это в свою очередь вызывает гибель нейронов, синаптическую дисфункцию и потерю нейрональной пластичности. Однако в случае спорадической формы БА, на которую приходится более 95% случаев заболевания, причины, определяющие появление



нейротоксичных форм Аβета, остаются неясными. В качестве такой первопричины было предложено рассматривать развивающуюся с возрастом митохондриальную дисфункцию. Эта концепция, впервые сформулированная полтора десятилетия назад, получила название «гипотезы митохондриального каскада». Согласно ей, дисфункция митохондрий приводит к окислительному стрессу, отражающемуся в избыточном образовании в клетке активных форм кислорода (АФК), что провоцирует формирование агрегатов Аβета, которые в свою очередь оказывают разрушительное воздействие на митохондрии, запуская таким образом патологическую «цепную реакцию». Со временем роль АФК в развитии патологического каскада была подвергнута сомнению, но не связь патогенеза БА с дисфункцией митохондрий. Установление молекулярно-клеточных механизмов, определяющих эту связь, может выявить новые терапевтические мишени, воздействие на которые позволит предотвращать или останавливать развитие БА, так как многочисленные попытки воздействовать непосредственно на продукцию и/или агрегацию Аβета с целью лечения этого смертельного заболевания до настоящего времени были безуспешными. Однако возможности исследования взаимосвязи митохондриальной дисфункции с возникновением и развитием БА на организменном уровне во многом сдерживаются отсутствием адекватных экспериментальных моделей. Одной из таких моделей могла бы быть линия преждевременно стареющих крыс OXYS, полученная в Институте цитологии и генетики СО РАН, у которой с возрастом развиваются все характерные признаки БА. Но вопрос о вкладе структурно-функциональных изменений митохондрий в инициацию и развитие патологических молекулярных каскадов БА у крыс OXYS оставался открытым. Таким образом, диссертационная работа М.А. Тюменцева, посвященная поиску ответа на этот вопрос, вне всякого сомнения является крайне актуальной.

### **Научная новизна исследования**

Диссертантом впервые определена динамика изменения количества митохондрий, а также их ультраструктуры, в нейронах гиппокампа крыс OXYS с времени завершения формирования мозга до старческого возраста. Установлено, что развитию признаков БА у крыс OXYS предшествуют структурно-функциональные изменения митохондрий гиппокампа: в доклинический период (возраст 20 дней) регистрируется снижение, по сравнению с крысами Вистар, активности дыхательной цепи, усилены генерация АФК и митохондриальное слияние, ведущее к образованию крупных митохондрий. Манифестация (возраст 4-5 мес.) и прогрессия (18-24 мес.) признаков БА у крыс OXYS протекают на фоне значительно сниженного количества митохондрий в нейронах гиппокампа, снижения активности дыхательной цепи, нарушений их ультраструктуры, митохондриальной динамики и коммуникации с эндоплазматическим ретикулумом при отсутствии отличий от контрольных крыс Вистар в уровне генерации АФК митохондриями мозга. Обнаружено, что накапливающийся в период активной прогрессии признаков БА в нейронах гиппокампа крыс OXYS Аβета локализуется в мембране митохондрий, их матриксе, а также в цитоплазме, ядре и отростках нейронов. Впервые показано, что способность митохондриального антиоксиданта SkQ1 смягчать проявления признаков БА у старых крыс OXYS на стадии значительных нейродегенеративных изменений связана с подавлением деструктивных изменений митохондриального аппарата в нейронах гиппокампа.

### **Достоверность и обоснованность научных результатов**



Диссертация М.А. Тюменцева имеет традиционную структуру и состоит из введения (раздел «Общая характеристика работы»), обзора литературы, описания использованных материалов и методов, представления собственных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок и 1 таблицу. Список литературы включает 163 источника. Экспериментальный материал, полученный в ходе диссертационного исследования, изложен логично и ясно. Выбор объекта и методов исследования полностью соответствует поставленным задачам.

Во введении («Общая характеристика работы») автор рассматривает актуальность и степень разработанности темы исследования и логично подходит к формулировке цели и задач исследования. В этом разделе автор также формулирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, и представляет положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы содержит две главы и заключение. Первая глава обзора состоит из четырех подразделов, в которых подробно рассмотрены экспериментальные основания гипотез амилоидного и митохондриального каскадов, а также проведён анализ работ, посвящённых использованию антиоксидантов в профилактике и лечении БА. Вторая глава обзора посвящена критическому анализу существующих биологических (животных) моделей БА, включая генно-модифицированные и нетрансгенные модели. Отдельно обсуждаются опубликованные данные, относящиеся к использованию линии крыс OXYS как модели спорадической формы БА. В заключении автор кратко суммирует изложенную информацию и акцентирует её связь с предпосылками диссертационного исследования. В целом обзор литературы хорошо структурирован, информационно насыщен и даёт полное представление о проблематике диссертационного исследования.

Раздел «Материалы и методы» написан подробно, использованные методы и экспериментальные подходы изложены с указанием всех необходимых деталей. В работе использован комплексный подход, включающий применение разнообразных методов для решения поставленных диссертантом задач. Среди них электронная микроскопия, иммуногистохимия, метод гель-электрофореза белков с количественным иммунохимическим анализом, препаративные и аналитические биохимические методы, позволяющие получать и характеризовать препараты клеточных органелл и определять количество и активность ферментов. Комплексный подход, использованный диссертантом, безусловно заслуживает высокой оценки. Для статистической обработки полученных данных автором была выбрана адекватная статистическая модель с использованием двухфакторного дисперсионного анализа и однофакторного дисперсионного анализа (Newman-Keuls test).

Раздел «Результаты» состоит из 7 подразделов и посвящён исследованию (1) возрастных изменений морфологических параметров митохондрий пирамидальных нейронов гиппокампа крыс OXYS, (2) нарушений митохондриальной динамики в нейронах гиппокампа крыс OXYS, (3) локализации мономерных форм Аβ в нейронах, (4) генерации АФК митохондриями клеток мозга крыс Вистар и OXYS, (5) изменений экспрессии белка-разобщителя UCP2 и (6) активности комплексов дыхательной цепи митохондрий в нейронах мозга крыс Вистар и OXYS с возрастом, (7) влияния митохондриального антиоксиданта SkQ1 на структурно-функциональные параметры митохондрий старых крыс OXYS. Автором выполнена значительная экспериментальная работа, совокупные результаты которой однозначно указывают на то, что структурно-функциональные изменения митохондрий нейронов мозга крыс OXYS предшествуют развитию признаков БА. Получены интересные данные о



механизме действия митохондриального антиоксиданта SkQ1, способного смягчать проявление ключевых признаков БА у старых крыс OXYS.

В разделе «Обсуждение результатов» автор анализирует собственные результаты и сопоставляет их с литературными данными, что позволяет ему в дальнейшем сформулировать выводы о связи развития признаков БА у крыс OXYS с дисфункцией митохондрий и о механизмах влияния митохондриального антиоксиданта SkQ1 на проявление признаков БА у крыс OXYS.

В целом экспериментальная часть диссертационной работы выглядит как хорошо спланированное многоплановое исследование, наиболее важные итоги которого коротко суммированы в разделе «Заключение». Выводы диссертации обоснованы, соответствуют задачам исследования и полученным результатам. По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе – 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК и тезисы 5-ти докладов в сборниках трудов научных конференций. Следует особо отметить, что все статьи опубликованы в журналах с высоким импакт-фактором, причём три из них – в престижных международных рецензируемых профильных журналах, включая две публикации в журналах, специализирующихся на проблематике, связанной с БА. Автореферат соответствует основным положениям диссертации и в полном объеме отражает её содержание.

Принципиальных замечаний по работе нет. В то же время есть ряд замечаний технического характера:

1. Название диссертационной работы в целом представляется не совсем удачным. Использование оборота «Анализ вклада» может подразумевать, что автор либо сумел вычленить и оценить (качественно или количественно) вклад дисфункции митохондрий в развитие признаков БА у крыс OXYS из вклада других факторов, либо что автор сумел вычленить и оценить вклады различных структурно-функциональных изменений митохондрий нейронов крыс OXYS в развитие у них признаков БА. Однако этого автором сделано не было. Совокупность полученных им результатов однозначно указывает только на то, что различные проявления дисфункции митохондрий предшествуют появлению признаков БА у крыс OXYS (что и сформулировано в одном из двух положений, выносимых на защиту).

2. Автором не определено понятие «удельное количество MOAS в нейропиле» (стр. 58 диссертации). Не ясно, как оно соотносится с количеством протяжённых митохондрий на один отросток (стр. 59), что затрудняет восприятие результатов, представленных на рис. 10.

3. В тексте диссертации, к сожалению, присутствует значительное количество орфографических и грамматических ошибок, а также используется лабораторный жаргон (например, «сонцировали» вместо «обработывали ультразвуком», стр. 47, или «бэнды» вместо «полосы», стр. 48).

4. Ссылки на гипотезу «митохондриального каскада» встречаются несколько раз в тексте диссертации как Swerdlow et al., 2014 или Swerdlow et al., 2017. Однако в списке литературы данных работ нет.

5. В разделе, посвящённом работе с лабораторными животными, не указаны документы, регламентирующие такую работу в организации, где выполнялось диссертационное исследование.

Перечисленные выше замечания не являются критическими и не снижают высокого уровня работы в целом.

**Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК**



Диссертационная работа М.А. Тюменцева представляет законченное, актуальное и оригинальное исследование, выполненное на высоком научном и методическом уровне. Результаты исследования существенно дополняют фундаментальные знания о связи между патогенезом БА и нарушениями структуры и функций митохондрий нейронов. Полученные в диссертационной работе М.А. Тюменцева результаты представляют новые экспериментальные аргументы в пользу гипотезы «митохондриального каскада» и делают линию крыс OXYS перспективной животной моделью для тестирования различных митохондриальных антиоксидантов как потенциальных средств лечения и/или профилактики БА. Результаты диссертационного исследования М.А. Тюменцева могут быть использованы при планировании и проведении научных исследований в научно-исследовательских организациях Российской Федерации, таких как Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Институт физиологически активных веществ РАН, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институт белка РАН, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, а также в образовательном процессе при чтении лекций студентам медико-биологических специальностей высших учебных заведений РФ.

Диссертация М.А. Тюменцева соответствует требованиям пункта 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №824 от 24.09.2013 г. с изменениями №335 от 21.04.2016 г., а её автор Тюменцев Михаил Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв заслушан и утверждён на протеемном семинаре ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ) 11 октября 2018 г., протокол №17\_18.

Отзыв подготовили

Главный научный сотрудник  
службы проектного управления  
координационно-аналитического отдела  
ИБМХ,  
доктор химических наук, профессор

Бодоев  
Николай Васильевич

Ведущий научный сотрудник,  
руководитель группы транскриптомного  
анализа ИБМХ,  
кандидат биологических наук

Радько  
Сергей Павлович

119121 Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.8 Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ)  
телефон: 8 499 246-69-80, e-mail: inst@ibmc.msk.ru

