

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шиловского Григория Александровича
на тему: «Поли(ADP-рибозил)ирование белков в культивируемых
клетках: влияние «стационарного старения» и различных биологически
активных соединений»
по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Г.А. Шиловского направлена на выявление возможных взаимосвязей между процессами старения и поли(ADP-рибозил)ированием (PAR-ированием) белков, а также на поиск ингибиторов поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP), которые могли бы послужить разработке средств лечения ряда распространенных возрастных заболеваний. Процессы старения тканей, отдельных органов и организма в целом снижают сопротивляемость к воздействию многих патологических факторов, приводящих к серьезным заболеваниям. В этой связи изучение механизмов старения на клеточном и молекулярном уровнях является важной фундаментальной задачей, решение которой необходимо для максимально возможного предовращения снижения качества жизни человека.

Поли(ADP-рибоза)-полимераза-1 (PARP-1) является высокомолекулярным белком со сложной мультидемонной структурой, последствия функциональной активности которой проявляются разнообразно и неоднозначно для физиологии клеток разных типов. Наиболее признанная и важнейшая роль PARP-1 заключается в том, что она инициирует процессы репарации одноцепочечных повреждений ДНК. Наиболее частой причиной таких повреждений является образование активных форм кислорода (АФК), вызывающих окисление оснований нуклеиновых кислот и разрыв цепи ДНК. Основным источником АФК в клетках считаются митохондрии, которые при

патологических состояниях (ишемии, гиперстимуляции клеточных рецепторов, действии экзотоксинов и т.д.) производят АФК в концентрациях, значительно превышающих потребности клеток для нормального функционирования. В патологических условиях митохондрии, генерируя избыток АФК, вызывают гиперактивацию PARP-1, которая в ответ расходует слишком много никотинамид динуклеотида (NAD⁺) в реакциях аутополи-ADP-рибозилирования и PAR-ирования других ядерных белков. В результате возникает дефицит NAD⁺, необходимого митохондриям для производства АТФ, и развивается ситуация "порочного круга": митохондрии гиперактивируют PARP-1, а она, в свою очередь, создает дефицит NAD⁺ для митохондрий и, соответственно, энергетическое голодание для всей клетки. Если патологические процессы имеют "взрывной" характер (например, инфаркт миокарда или мозга) то наступает быстрая гибель клеток, особенно таких энергозависимых, как кардиомиоциты и нейроны. Если процессы, ведущие к нарушению структуры ДНК развиваются постепенно, то активация PARP-1 (а также PARP-2) может приводить к нарушениям циркадных ритмов и более отдаленным последствиям, связанным со старением организма, в том числе, нейродегенеративным заболеваниями. В этой связи диссертационная работа Г.А. Шиловского является безусловно актуальной, поскольку предлагает модель изучения молекулярно-клеточных механизмов старения, используя культуры различных типов клеток. Подобный подход служит необходимым дополнением исследований на животных, будучи более экономичным и менее трудозатратным и обеспечивая более легкий контроль внутриклеточных процессов, связанных с поли(ADP-рибозил)ированием белков, в том числе, поиск ингибиторов белков семейства PARP.

Новизна исследований и полученных результатов

В диссертационной работе Г.А. Шиловского впервые предпринята попытка выяснить причинно-следственные связи между процессами,

характерными для старения организма и поли(ADP-рибозил)ирования белков. В работе было детально изучено влияние «стационарного старения» на показатели активности PARP с использованием оригинальных клеточных моделей. На основании полученных на этих моделях результатов впервые предложен безразмерный показатель активности PARP. Обнаружено, что способность клеток к поли(ADP-рибозил)ированию белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК с «возрастом» культуры клеток снижается. Автором впервые была продемонстрирована способность ряда флавоноидов вызывать ингибирование PARP, а также выявлена хорошая корреляция между PARP-ингибирующим и цитопротекторным (противонекротическим) действием флавоноид-содержащей субстанции EGb-761. Найдено, что ингибирование PARP не замедляет "стационарное старение", а, вероятно, способствует адаптации клеток к неблагоприятным факторам окружающей среды, в частности, к окислительному стрессу.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа Г.А. Шиловского значительно расширяет представления о роли системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в процессах старения. С точки зрения практического применения результатов работы прежде всего заслуживает внимания обнаруженное автором наличие четкой корреляции между предложенными автором показателями активности PARP и «возрастом» культур, что позволяет рассматривать данные показатели в качестве новых потенциальных биохимических маркеров старения. Другими, не менее важным с точки зрения теоретической и практической значимости, являются данные, касающиеся PARP-ингибиторного действия ряда субстанций природного происхождения, входящих в состав многих пищевых продуктов и лекарственных средств. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых подходов для профилактики ряда возрастных заболеваний. Полученные

результаты также могут способствовать объяснению не раскрытых пока механизмов действия препаратов, содержащих флавоноиды.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Г.А. Шиловского построена в основном по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: Оглавление, Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы. Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Благодарности руководителям работы и коллегам, помогавшим ее выполнить. Завершается диссертация списком использованных литературных источников, включающим 312 работ, из которых 21% опубликованы за последние 10 лет. Объем Диссертации составляет 157 страниц, содержит 30 рисунков и 4 таблицы.

Во введении описана фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа – исследование первопричин и механизмов развития старения, а также более узкая проблема – роль системы поли(ADP-рибозил)ирования в процессах старения. Приведены все основные термины и понятия, используемые в работе, даны их четкие определения. Затронута проблема моделирования процессов старения в экспериментах *in vitro*, и описаны возможные подходы к ее решению. Кроме того, во введении приводится обоснование актуальности темы исследования, сформулированы цель и задачи исследования, теоретическая и практическая значимость работы и другие необходимые сведения о работе.

Обзор литературы включает 8 тематических разделов, в которых автором исчерпывающе и систематически изложены теоретические основы тех явлений, с которыми непосредственно сталкивается диссертант в своих экспериментальных исследованиях. Список проанализированной и процитированной автором литературы превышает на 20-40% типичный объем Литобзора кандидатской диссертации и даже немного превышает по количеству страниц главу Результаты. В основу положены обзоры, опубликованные автором и его коллегами в журнале «Биохимия». Особенно

интересными, на мой взгляд, являются разделы 1.4.-1.6., в которых логично подобраны сведения о возможной роли системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в детерминации продолжительности жизни, и изменениях ее состояния при старении организма и изменении пролиферативного статуса клетки. Очень важно, что в обзоре также рассмотрены общепринятые методические подходы, используемые для моделирования онтогенетических изменений, характерных для старения, в культурах клеток, и указаны основные «подводные камни», ожидающие исследователя при использовании того-или иного подхода. Обзор изложен лаконичным научным языком, доступным для неспециалистов в данной области и снабжен рисунками и таблицами, которые значительно облегчают его восприятие не в ущерб объему информации.

Глава «Материалы и методы» содержит полный список использованных реагентов и подробное описание методов исследования. Используемые автором экспериментальные модели и подходы полностью соответствуют поставленным в работе целям и задачам, что позволило автору всесторонне охарактеризовать поведение системы поли(ADP-рибозил)ирования белков в процессе «стационарного старения». В работе использованы корректные методы статистического анализа.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит 9 разделов. Учитывая использованные в работе методические подходы и содержание задач, все проведенные автором исследования можно условно разделить на три части, первая из которых (разделы 3.1.-3.3.) посвящена доказательству релевантности выбранной клеточной модели для изучения процессов «стационарного старения», вторая (разделы 3.4.-3.7.) – изучению влияния «стационарного старения» на показатели активности PARP и экспрессию PARP-1 и PARP-2 и третья (разделы 3.8.-3.9.) – изучению PARPингибиторной активности ряда флавоноидов и флавоноид-содержащих субстанций.

В начале первой части работы приведено теоретическое обоснование использованной экспериментальной модели, которое основано на многочисленных данных, полученных в лаборатории А.Н. Хохлова, при активном участии Г.А. Шиловского. Затем автором приводятся дополнительные данные, показывающие, что для данной клеточной модели характерно накопление с «возрастом» сенесцентных клеток и снижение пролиферативной (регенеративной) активности среды роста.

Во второй части работы, являющаяся основной, Григорий Александрович приводит результаты комплексного анализа влияния «стационарного старения» на экспрессию и показатели активности PARP. Значительная часть этого раздела посвящена разработке новых методических подходов для оценки состояния системы поли(ADP-рибозил)ирования на основе анализа различных видов активности PARP в пермеабиллизированных и интактных клетках. Автор вводит понятия стимулированной повреждениями ДНК активности и нестимулированной активности PARP, и на их основе — показатели степени активации PARP экзогенными и эндогенными индукторами и «способности клеток к активации системы PAR-ирования белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК». Далее автором были получены оригинальные данные, показывающие, что «стационарное старение» сопровождается увеличением базального уровня PAR в клетках и нестимулированной активности PARP, а также снижением стимулированной активности и способности клеток к PAR-ирования белков в ответ на вновь возникающие повреждения ДНК. Проведенное далее дополнительное исследование показало, что наблюдаемые изменения в показателях активности PARP не связаны с изменением экспрессии двух белков семейства PARP, вносящих наибольший вклад в процесс PAR-ирования белков в клетке — PARP-1 и PARP-2.

Ключевым для интерпретации полученных данных представляются также эксперименты в которых было показано, что фармакологическое

ингибирование PARP не влияет на скорость развития и выраженность проявлений признаков «стационарного старения» в культивируемых клетках. На основании всей совокупности полученных в этой части исследования результатов автор приходит к выводу, что наблюдаемые в данной экспериментальной модели изменения в состоянии системы PAR-ирования белков не провоцируют развитие возраст-зависимых деструктивных процессов в клетках, а являются результатом усиливающегося с возрастом давления неблагоприятных факторов внутренней и внешней среды.

В третьей части работы автор показывает, что ряд флавоноидов и флавоноид-содержащая фракция из экстракта *Ginkgo biloba* (EGb 761) содержит компоненты, способные вызывать ингибирование поли(ADP-рибоза)полимеразной активности в клетках животных, что позволяет рассматривать их как потенциальные цитопротекторы при ряде хронических и острых патологий, сопровождаемых окислительным стрессом и воспалением. Следует отметить, что каждый раздел предваряется обоснованием и объяснением необходимости проведения определенных исследований, а в конце приводится подробный и критический анализ полученных данных. Также проведено сопоставление полученных данных с результатами других исследований.

Анализ главы Результаты и обсуждение показал, что автором совместно с коллегами проделана большая и трудоемкая экспериментальная работа. При этом каждый новый этап работы логически вытекает из предыдущего, полученные данные подвергнуты тщательному анализу. Стоит обратить внимание на то, что большинство обнаруженных экспериментальных фактов получено и описано Г.А. Шиловским впервые. В целом следует отметить, что полученные в данном исследовании результаты выглядят убедительными, все выносимые на защиту положения строго научно обоснованы. Выводы четко сформулированы и позволяют полностью

оценить научную и практическую значимость проведенных исследований. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Публикации и апробация работы

Содержание диссертационной работы достаточно полно представлено в публикациях. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Scopus или Web of Science, 2 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК), а также 4 тезисов докладов в сборниках трудов научных конференций. Следует отметить 2 фундаментальных обзора по теме диссертации, в которых Г.А. Шиловский является первым автором. Результаты диссертационной работы были также многократно представлены на международных и отечественных научных форумах.

Автореферат, изложенный на 26 страницах, дает полное представление о структуре, объеме и содержании диссертационной работы, а также использованных в ней методах и подходах, научной и практической значимости полученных результатов.

Замечания к диссертационной работе

1. Автор не объясняет, чем был обусловлен выбор клеток китайского хомячка линии ВП-dii-FAF28 для моделирования «стационарного старения»? Есть ли какие-то ограничения в использовании других типов клеток, а также других способов ограничения пролиферации клеток при моделировании «стационарного старения»? Например, линий, полученных из нейронов центральной нервной системы, которые относятся к наиболее долгоживущим клеткам организма и поэтому заслуживают особого внимания при выборе клеточной модели старения.
2. Автор неоднократно упоминает в Обзоре литературы о важной роли митохондрий в выживании клеток. Более того, окислительный стресс является одним из двух основных экспериментальных подходов при достижении стимулированной активности PARP. Не ставя под сомнение

правомерность использованных в работе методов анализа жизнеспособности клеток, их арсенал мог бы быть расширен измерениями показателей функционального состояния митохондрий в клетках, например, их трансмембранного потенциала.

3. В работе показано, что «стационарное старение клеток в культуре сопровождается снижением плотности культуры. Однако автор не проводит дополнительный анализ возможных причин этого явления. Является ли это причиной только гибели клеток (тогда, по какому механизму?) или снижения адгезивных свойств клеток. В этом случае условно живые клетки должны были обнаруживаться и в среде культивирования.

4. Одной из основных предпосылок работы является то, что система PAR-ирования играет важную роль в поддержании стабильности генома и поэтому должна замедлять процессы старения. Как тогда интерпретировать полученные автором противоречивые результаты: с одной стороны, в ходе «стационарного старения» стимулированная активность PARP снижается, а с другой - внесение ингибитора PARP с самого начала культивирования клеток не влияет на выживаемость. Гипотезу адаптационного приспособления клеток было бы желательно подкрепить анализом литературы по этой проблеме.

5. В литературном обзоре (или в Методах) был бы полезен раздел, посвященный методам оценки геропротекторной и геропромоторной активности биологически активных соединений.

Приведенные выше замечания имеют чисто технический характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 – «Биоинженерия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

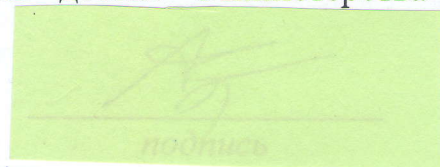
Таким образом, соискатель Шиловский Григорий Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

заведующий Лабораторией нейробиологии и основ развития мозга федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Сурин Александр Михайлович



«24» сентября 2019 г

Контактные данные:

Тел. +7(499) 134 1445; e-mail: surin_am@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 14.03.03 - Патологическая физиология

Адрес места работы:

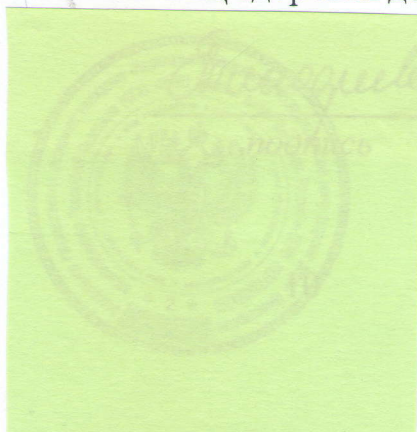
ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

119991, г. Москва, ул. Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1

Тел.: +7(495)967 1420; <http://nczd.ru/>

Подпись Сурина Александра Михайловича удостоверяю:

Ученый секретарь ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России



к.м.н. А.Г. Тимофеева

«24» сентября 2019 г