

## АННОТАЦИЯ

диссертации на соискания степени доктора философии (PhD)

по специальности «6D060700-Биология»

**Усипбек Ботагоз Абдихановна**

**«Исследование роли окислительного стресса при изменении метаболизма митохондрий»**

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена исследованию роли окислительного стресса при изменении метаболизма митохондрии. В работе рассматриваются метаболические пути сульфидов и изменение биосинтеза CoQ.

**Актуальность темы исследования.** Для жизнедеятельности всех аэробных организмов нужен кислород. Примерно 5% кислорода используемого тканями превращаются в свободные радикалы. В клетке постоянно образуются активные формы кислорода в виде свободных радикалов, но в связи с тем, что их уровень является низким, клетка инактивирует их с помощью антиоксидантной системы. Увеличение интенсивности образования свободных радикалов приводит к развитию патологических состояний. При резком увеличении активных форм кислорода и при недостаточном функционировании антиоксидантной системы нарушается биохимия клетки и возникает окислительный стресс.

Увеличение свободных радикалов приводит к уменьшению уровня АТФ и нехватке клеточной энергии. В результате нарушается ряд процессов биосинтеза в дыхательной цепи митохондриальных комплексов. Кроме того, дисфункция митохондрий и накопление митохондриальных мутаций в тканях приводят к процессу старения и патогенезу ряда заболеваний, характеризующихся нейродегенерацией. Одним из этих процессов является сульфидный метаболизм и биосинтез CoQ. Основным элементом биосинтеза CoQ является коэнзим Q10. Это компонент дыхательной цепи митохондрий. Нарушение биосинтеза коэнзима Q10 может стать причиной ряда митохондриальных заболеваний. Митохондриальные заболевания представляют собой сложную гетерогенную группу наследственных заболеваний и патологических состояний, вызванных нарушением структуры и функции митохондрий и тканей. Одно из известных заболеваний - синдром Ли. Сульфидный метаболизм играет ключевую роль при дефиците коэнзима Q10. Сульфидный метаболизм в клетках млекопитающих включает транссульфурацию (биосинтетический путь) и пути окисления (катаболический) сероводорода (H<sub>2</sub>S). Нарушения окисления H<sub>2</sub>S могут способствовать окислительному стрессу при дефиците кофермента Q или кофермент Q может играть синергетическую роль с окислительным стрессом в патогенезе тканевой специфичности.

Так окислительный стресс является первичной причиной или одним из основных звеньев патогенеза большинства заболеваний, особое место в антиоксидантной системе организма принадлежит глутатиону. Глутатион - это компонент защитной системы,

нейтрализующий негативные изменения, вызванные активными формами кислорода в клетке. Глутатион играет важную роль в жизнедеятельности клетки. С помощью модуляции уровня активных форм кислорода в митохондриях, глутатион может влиять на процесс гибели клеток. Снижение уровня глутатиона в митохондриях приводят к повышению уровней активных форм кислорода и азота, нарушению функции этой органеллы, что является причиной клеточной гибели и может привести к переходу процесса апоптоза в некроз.

Влияние таких процессов на метаболизм митохондрий вызывает дефицит коэнзима Q при ряде заболеваний. В настоящее время для профилактики используется множество доклинических методов лечения. Если один из этих методов положительно влияет на один орган исследуемого объекта, он может не оказывать положительного воздействия на другой орган. Возникновение многих митохондриальных заболеваний в результате метаболической дисфункции митохондрий, вызванной оксидативным стрессом, и отсутствие лечения вызывает беспокойство во всем мире.

**Цель исследования.** Основная цель исследования заключалась в выявлении изменений в сульфидном метаболизме за счет диетических ограничений содержания серосодержащих аминокислот в рационе мышей с дефицитом CoQ и определения изменения сульфидного метаболизма после обработки N-ацетил-L-цистеином, а также оценка показателей системы глутатиона в группах мышей с недостатком Комплекса I.

Для достижения цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Определение процента выживаемости с помощью диетических ограничений уровня серосодержащих аминокислот в рационе групп мышей с дефицитом CoQ или путем лечения с использованием N-ацетил-L-цистеина.

2. Исследование изменения первого фермента сульфидного метаболизма - сульфидхинон оксиредуктазы (SQOR) и оценка уровня цистатионин  $\gamma$ -лиазы (CSE) и цистатионин- $\beta$ -синтазы (CBS) в митохондриальных фракциях мозга, почек и мышечной ткани после диетических ограничений в рационе групп мышей с недостатком CoQ по уровню серосодержащих аминокислот или после обработки N-ацетил-L-цистеином.

3. Определение изменений общего глутатиона, включая ферменты глутатиона (GPx и GRd), в митохондриальных фракциях мозга, почек и мышечной ткани, с помощью диетических ограничений количества серосодержащих аминокислот в рационе мышей или после обработки N-ацетил-L-цистеином.

4. Сравнение различий в уровнях CoQ9, CoQ10, DMQ9 и в соотношении DMQ9/CoQ9 после обработки тканей мозга, почек и мышц с помощью SAAR и NAC.

5. Оценка процента выживаемости групп мышей с дефицитом Комплекса I и определение общей системы глутатиона, включая уровни глутатион-зависимых ферментов (GPx и GRd).

**Материалы исследования.** В качестве материала исследования были использованы модели мышей с дефицитом CoQ и комплексом I.

**Методы исследования.** Были использованы: экспериментальная выборка животных, Вестерн-блоттинг, высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой, метод нативного электрофореза, флуоресцентная спектроскопия (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, США), спектрофотометрия (NanoDrop), методы статистического анализа (*GraphPad Prism*).

**Научная новизна исследования.** Впервые было проведено исследование в условиях *in vivo* на модели мышей с недостатком CoQ с помощью последовательной постановки диетических ограничений уровня серосодержащих аминокислот в рационе с целью доклинической терапии или лечения N-ацетил-L-цистеином. Было обнаружено, что влияние недостатка CoQ на ткани мышей в некоторых случаях могут иметь различные результаты. На основании полученных данных были проведены исследования по разработке терапевтического подхода. Определены их эффективная дозировка и продолжительность использования.

В условиях *in vivo* было показано увеличение в мышечной ткани уровня SQOR - первого фермента сульфидного метаболизма после постановки диетических ограничений уровня серосодержащих аминокислот в рационе или после обработки N-ацетил-L-цистеином, а в тканях почек повышение уровня SQOR наблюдалось только после обработки N-ацетил-L-цистеином.

Впервые было определено увеличение уровня SQOR у мышей *Ndufs4<sup>+/+</sup>* на моделях мышей с дефицитом комплекса I, было также обнаружено увеличение уровней общего глутатиона и GSSG/GSH по сравнению с контрольными группами.

**Теоретическая значимость работы.** Результаты диссертационной работы в экспериментах на группах мышей с дефицитом CoQ выявили влияние диетических ограничений уровня серосодержащих аминокислот (SAAR) в рационе и диетические ограничения N-ацетил-L-цистеина (NAC) возможность доклинической терапии или лечения N-ацетил-L-цистеином. Эксперименты на группах мышей с дефицитом комплекса I показали повышение системы глутатиона. Результаты исследования предоставляют уникальную возможность проанализировать использованные разработки и дополнить теоретическую базу исследований в данной проблеме.

**Практическая ценность работы.** На основании полученных данных были разработаны способы лечения мышей с недостатком CoQ и профилактики мышей с дефицитом комплекса I. Используемые в рационе мышей Coq9<sup>R239X</sup> диетические ограничения уровня серосодержащих аминокислот (SAAR) или обработка N-ацетил-L-цистеином (NAC) при проведении исследования дают возможность для основания новой терапии, которое может использоваться как в качестве дополнительного, так и в качестве отдельного лечения.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Определены процентные показатели выживаемости групп мышей с дефицитом CoQ путем введения ограничений в рацион питания.

2. Были показаны повышения уровня SQOR в тканях мозга опытных мышей *Coq9<sup>R239X</sup>* после диетических ограничений по уровню серосодержащих аминокислот в почечных тканях после обработки N-ацетил-L-цистеином и в мышечных тканях после обработки с SAAR и NAC.

3. Установлено, что влияние уровней цистатионин  $\gamma$ -лиазы (CSE) и цистатионин- $\beta$ -синтазы (CBS) на ткани мозга, почек и мышц у опытных групп мышей при обработке с SAAR и NAC могут иметь различные результаты.

4. Выявлены изменения общего глутатиона в митохондриальных фракциях мозга, почек и мышечной ткани, включая глутатион-зависимых ферментов (GPx и GRd) после постановки диетических ограничений уровня серосодержащих аминокислот в рационе групп мышей или после обработки N-ацетил-L-цистеином.

5. Обнаружены различные эффекты после обработки с помощью SAAR и NAC уровней CoQ9, CoQ10, DMQ9 в тканях мозга, почек и мышц, а также разница в соотношении DMQ9/CoQ9 и в образовании комплексов I, II, III, IV митохондриальной дыхательной цепи, суперкомплекса (SC) во фракциях митохондрий почек после лечения SAAR и NAC.

6. Определены особенности общей системы глутатиона, в том числе уровня глутатион-зависимых ферментов (GPx и GRd), и проведена оценка процентных показателей выживаемости в группах мышей с дефицитом Комплекса I.

**Личный вклад диссертанта в обобщение результатов научной работы, рекомендуемой к защите.**

Обзор литературных источников исследовательской работы, определение поставленных целей и задач, а также статистический анализ и обработка результатов практической работы и сбора данных проводились при личном участии автора.

**Связь работы с программой научных исследований.** Данная работа была направлена на изучение изменения окислительного стресса при изменении метаболизма митохондрии. Работа проводилась в рамках проекта лаборатории молекулярной биологии Центра биомедицинских исследований Университета Гранады (руководитель проекта - профессор Л.К. Лопес, Университет Гранады). Часть работы выполнена в лаборатории кафедры биофизики, биомедицины и нейробиологии Казахского национального университета имени аль-Фараби.

#### **Апробация работы**

Основные принципы диссертации и результаты исследования были представлены и обсуждены на следующих международных и национальных научных конференциях:

Международная конференция студентов и молодых ученых Международные Фарабиевские чтения «Фараби Элемі» (2019 г, Алматы);

- Международная научная конференция I CONGRESS OF RESEARCHERS FROM THE PTS» (2019, Гранада, Испания);

- Международная конференция студентов и молодых ученых Международные Фарабиевские чтения «Фараби Әлемі» (2020 г, Алматы).

- Международная конференция студентов и молодых ученых Международные Фарабиевские чтения «Фараби Әлемі» (2022 г, Алматы).

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 9 научных изданиях, в том числе 1 статья в журналах на базе Web of Science и Scopus, 3 статьи в научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК, 5 тезисов в материалах международных и республиканских конференций.

**Структура диссертации.** Диссертация состоит из 92 страниц и нормативных ссылок, обозначений и сокращений, введения, литературного обзора и материалов и методов, результатов исследования и заключения, 211 использованных источников и 38 рисунков.