

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України
04 ЛЮТ 2016р
Вх. № 41/03-07 *М.К.*

ВІДЗИВ
офіційного опонента

На дисертацію *Акопової Ольги Валеріївни*

«Роль мітохондріальної пори в регуляції трансмембранного обміну Ca^{2+} , енергозалежних і вільнорадикальних процесів в мітохондріях»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук
за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

Актуальність теми. Функціональний стан і біохіміко-фізіологічні властивості клітин багато в чому залежать від функції мітохондрій, в тому числі їх мембранних структур. Однією з таких важливих структур є мітохондріальна пора, функція якої залежить від концентрації іонів Ca^{2+} . Ці катіони відіграють надзвичайно важливу роль у регуляції багатьох клітинних процесів і, зокрема, процесів, що відбуваються у мітохондріях. Вони модулюють активність дихального ланцюга, процеси синтезу АТФ, утворення активних форм кисню, активність мітохондріальних пор як неселективних іонних потенціалзалежних каналів. Такі канали регулюються, окрім іонів Ca^{2+} , низкою інших ефекторів, до яких належать АТФ, АДФ, АФК, АФА, гормони, медіатори й інші біологічно активні сполуки та іони.

Вважається, що основним структурним компонентом мітохондріальної пори є АТФ-синтетаза внутрішньої мітохондріальної мембрани, димеризація якої і утворює неселективний іонний канал, який у стані високої активності знижує мембранний потенціал і пригнічує енергетичний метаболізм мітохондрій, знижує концентрацію іонізованого кальцію у мітохондріях, що істотно впливає на його цитозольну концентрацію, індукує мітоптоз, апоптоз та некроз клітини. Все це свідчить, що мітохондріальну пору можна вважати основною мішенню в терапії патології клітин і тканин та організму в цілому.

Мітохондріальна пора є основною молекулярною мішенню адаптаційного механізму мітохондрій, ключову роль у якому відіграє АТФ-залежний K^+ -канал та сигнальні шляхи за участю протеїнкіназ, АФК і АФА. Щоб зрозуміти цей

механізм, необхідно вивчити зв'язок між АТФ-залежним транспортом K^+ і активністю мітохондріальної пори в обміні іонів Ca^{2+} , модуляції процесів синтезу АТФ і вільнорадикальних процесів утворення АФК і АФА. Усе це має як фундаментальне, так і прикладне значення для розробки стратегій корекції патологічних станів організму, зумовлених, в першу чергу, дисфункцією мітохондрій. Оскільки ці надважливі питання є основним завданням дисертації О.В. Акопової, її актуальність не викликає сумнівів.

Ступінь обґрунтованості і достовірності положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх новизна. Свідченням достатньої обґрунтованості та достовірності отриманих у дисертації результатів та зроблених висновків є високий методичний рівень роботи і вдале поєднання сучасних методичних підходів широкого діапазону. У розділі «Матеріали і методи» описано використані методи диференційного центрифугування, спектрометричної оцінки активності мітохондріальної пори, змін мембранного потенціалу і утворення гідропероксидів, флуоресцентної реєстрації концентрації іонізованого кальцію і АФК, потенціометричного вивчення транспорту протонів та змін рН, полярографічні методи визначення споживання кисню та процесів фосфорилування, метод оцінки ПОЛ за утворенням дієнових кон'югатів, методи біохімічної кінетики (використані для встановлення кінетичних констант транспортних процесів), методи визначення активності ферментів (за швидкістю утворення продуктів реакцій) та статистичні.

Серед результатів слід відзначити найважливіші та ті, що отримані вперше. Вперше показано, що регуляторний вплив іонів Ca^{2+} проявляється не тільки в блокуванні (що було відомо раніше), а й у активації мітохондріальної пори безпосередньо після повного зниження мембранного потенціалу. Іони Ca^{2+} активують мембранну пору в умовах її відкритого стану, і блокують в процесі її інактивації. На підтвердження цього автор приводить дані про те, що в умовах блокування уніпортера спостерігається лише часткове вивільнення Ca^{2+} із мітохондрій. Протонна провідність мембрани є необхідною умовою для реверсії Ca^{2+} -уніпортера і вивільнення катіонів із деенергізованих мітохондрій. Це є

підґрунтям для розгляду участі мітохондріальних пори і Ca^{2+} -уніпортера в транспортних процесах як паралельних реакцій першого порядку. Тобто, автором вперше оцінені внески мітохондріальної пори в транспорт іонів Ca^{2+} в умовах мембранної деполяризації. Така оцінка свідчить про участь пори у кальцієвій сигналізації в клітині. Концентраційний градієнт протонів повністю забезпечує умови, які необхідні для виходу іонів Ca^{2+} з деполяризованих мітохондрій. В цьому плані необхідно відмітити, що за даними автора потенціалзалежний вхід іонів Ca^{2+} у матрикс є енергозалежним процесом з використанням вільної енергії електрохімічного потенціалу протонів, а в деполяризованих мітохондріях $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -антипорт є електронейтральним і незалежним від мембранного потенціалу.

Відомо, що система транспорту іонів Ca^{2+} у мітохондріях утворює кальцієвий цикл, функціонування якого приводить до роз'єднання дихального ланцюга. Автор показала, що в умовах відкриття мітохондріальної пори при низьких концентраціях кальцію Ca^{2+} уніпортер залишається в активному стані. Активація кальцієвого циклу, яка підтримується одночасною роботою пори і Ca^{2+} -уніпортера, прискорює дихання і приводить до роз'єднання дихального ланцюга. Тобто, за таких умов мітохондріальна пора не приводить до деполяризації мітохондрій і виконує роль слабкого протонофорного роз'єднувача дихального ланцюга, що підтримує стабільну швидкість синтезу АТФ за рахунок зниження енергетичної ефективності фосфорилування.

В роботі вперше проаналізована роль мітохондріальної пори в процесах утворення АФК. Встановлено, що в стаціонарних умовах швидкість генерації АФК є потенціалзалежною і пропорційною швидкості Ca^{2+} -стимульованого дихання. Блокування транспорту електронів в дихальному ланцюзі внаслідок вивільнення цитохрому *c* сприяє потенціал-незалежному нелінійному росту швидкості утворення АФК. А такі процеси можуть сприяти патологічним змінам у функціонуванні мітохондріальної пори аж до індукції апоптозу. Їх попередження може здійснюватись, зокрема, шляхом регуляції синтезу АТФ внаслідок активації мітохондріального K^+ _{АТР}-каналу. Результати, отримані

автором, свідчать, що система окисного фосфорилування є однією з безпосередніх мішеней активаторів АТФ-залежних K^+ -каналів. Гальмування синтезу АТФ під впливом таких активаторів є інструментом регуляції енергетичного метаболізму мітохондрій, результатом чого є зниження активності проапоптичних процесів.

Згідно з концепцією автора, регуляторна функція мітохондріальної пори як Ca^{2+} -транспортного утворення мітохондріальної мембрани передбачає її участь в системі трансмембранного обміну іонів Ca^{2+} , що здійснює важливий внесок у окислювальний метаболізм, який обумовлений функціонуванням дихального ланцюга. Сама концепція, як і вирішення завдань дисертаційної роботи, істотно поглиблює розуміння молекулярних мембранних механізмів біоенергетичних процесів у мітохондріях. Результати роботи обґрунтовують уявлення про регуляцію функції мітохондріальної пори в умовах фізіологічної норми і можуть бути використані при розробці ефективних фармакологічних засобів корекції мітохондріальних дисфункцій.

Висновки роботи чітко сформульовані і логічно впливають з аналізу отриманих експериментальних даних. Наукові положення і результати дисертаційної роботи повністю викладені у 25 статтях у провідних вітчизняних та зарубіжних наукових часописах, апробовані на всеукраїнських та міжнародних наукових конференціях. Зміст автореферату повністю відповідає змісту дисертації.

Зауваження щодо змісту дисертації та загальний висновок. Проведені О.В. Акоповою експериментальні дослідження повністю відповідають меті дисертаційної роботи, а отримані дані дозволяють вирішити поставлені у роботі завдання. Разом з тим виникають деякі запитання, відповіді на які сприятимуть глибшому розумінню отриманих автором даних.

1. Автор, на думку опонента, недостатньо обґрунтувала в своїй роботі чистоту виділених мітохондрій і їх цілісність, використовуючи для цього, наприклад, визначення активності маркерних ферментів і методи електронної мікроскопії.

2. Мітохондрії автор виділяла із серця, печінки і мозку щурів. Проте в тексті і у підписах до рисунків нема конкретних вказівок на їх приналежність. Можливо, автор вважає, що мітохондріальні пори мітохондрій будь-яких клітин є універсальними і не мають будь-яких специфічних ознак?

3. Відкриття пори – це збільшення неспецифічної проникності мітохондріальних мембран, внаслідок якого через мембрану відбувається одночасний транспорт електролітів та неелектролітів. Як ці процеси узгоджуються із характеристиками МРТР як системи транспортування Ca^{2+} ?

Вказані доброзичливі запитання не знижують високої оцінки дисертаційної роботи. Загальний її аналіз свідчить, що це самостійне і завершене наукове дослідження, у якому представлені переважно нові науково обґрунтовані дані, що в сукупності є суттєвим внеском в біохімію біоенергетичних систем і процесів. Робота «Роль мітохондріальної пори в регуляції трансмембранного обміну Ca^{2+} , енергозалежних і вільнорадикальних процесів в мітохондріях» відповідає вимогам до докторських дисертацій, а її автор Акопова О.В. заслуговує наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Зав. НДС «Мембранології і цитології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

д.б.н., проф. Рибальченко В.К.,
Заслужений діяч науки і техніки
України

Підпис В.К. Рибальченка засвідчую
Заступник директора ННЦ «Інститут біології»



Коллеagues V. K.