

ВІДЗИВ офіційного опонента

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

Наразі в науці сформувалось уявлення, що розвиток численних захворювань, зокрема серцево-судинної і нервової систем, пов'язаний з дисфункціями на рівні мітохондрій. Одним із чинників функціональних порушень є відкриття мітохондріальної пори (mitochondrial permeability transition pore, МРТР) – неселективного каналу, відкриття якого веде до послаблення бар'єрних функцій мітохондріальної мембрани, розладу енергетичного метаболізму, індукції апоптозу і некрозу клітин. Отже, на даний час в науці сформувалась думка, що МРТР є основною молекулярною мішенню в терапії патологічних процесів в організмі. Тому дослідження біохімічних та біофізичних властивостей МРТР і механізмів регуляції її функціональної активності є нагальною потребою сучасних біомедичних досліджень.

Актуальність теми дисертації. Попри численні дослідження патогенетичних аспектів функціонування МРТР, сучасна наука щодалі більш виявляє свідчення регуляторних функцій пори, зокрема, щодо регуляції Ca^{2+} -гомеостазу мітохондрій. Оскільки кальцій та його надходження до матриксу є надзвичайно важливим чинником регуляції метаболічних процесів в цих органелах, визначення ролі МРТР в трансмембранному обміні Ca^{2+} заслуговує ретельного дослідження. За літературними даними, функціонування МРТР як Ca^{2+} -транспортувальної системи мітохондрій можливе тільки в її низькопровідних станах. Проте біохімічні механізми регуляції циклоспоринчутливого транспорту Ca^{2+} , а надто його біоенергетичні аспекти залишаються недослідженими. Сказане визначає актуальність роботи О.В. Акопової, яка спрямована на визначення і дослідження регуляторних функцій МРТР як Ca^{2+} -транспортувальної системи мітохондрій за її відкриття в станах субмаксимальної активності і з'ясування ролі МРТР в регуляції Ca^{2+} -гомеостазу а також важливих біохімічних процесів, залежних від енергетичного стану мітохондрій – синтезу АТФ і продукції АФК.

Дисертація написана за стандартною схемою і складається із вступу, двох оглядових розділів, методичної та експериментальної частин, заключного розділу і висновків. У вступній частині стисло і чітко обґрунтовано актуальність дослідження, сформульовано мету і окреслено новизну роботи та їх практичну значимість. В огляді літератури подано ґрунтовний аналіз наявних літературних даних щодо ролі катіон-транспортувальних систем (каналів і обмінників) в регуляції енергозалежних процесів в мітохондріях. Автор демонструє глибоку обізнаність

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України

05 ЛЮТ 2016 р

Вх.№

42/03-07 / [підпис]

також із сучасним станом досліджень МРТР, ідентифікації її структурних компонентів, біофізичних, біохімічних властивостей і механізмів регуляції. Цей останній розділ викликає особливий інтерес і може бути опублікований у вигляді окремої роботи, цікавої для широкого загалу дослідників. Натомість, викладення загальновідомих теоретичних положень у першому розділі видається дещо задовгим. Більш цікавим було б включення літературних даних стосовно можливих змін функціонування пори при різних патологічних станах та різних захворюваннях, у першу чергу – серцево-судинних, онкологічних, тощо. Також доцільно було б проаналізувати відомості щодо впливу різних класів фармакологічних засобів на функцію МРТР.

Обґрунтованість наукових положень і висновків дисертації. Метою дослідження є встановлення біохімічних механізмів функціонування і регуляції мітохондріальної пори як системи транспортування Ca^{2+} , з'ясування ролі цієї системи як модулятора енергозалежних і вільнорадикальних процесів в мітохондріях. Для досягнення поставленої мети автор використовує широкий арсенал сучасних біохімічних і фізико-хімічних методів дослідження, якими володіє на високому професійному рівні: абсорбційної та флуоресцентної спектроскопії, потенціометрії, полярографії, біохімічної кінетики і аналітичної біохімії. Переважна більшість експериментальних фактів встановлена шляхом поєднання різних методів дослідження. Експериментальні дані, на яких ґрунтуються основні положення і висновки роботи, добре узгоджуються між собою. Достовірність результатів і обґрунтованість висновків забезпечується використанням загальноприйнятих методів статистичного аналізу.

Новизна дисертаційної роботи. Новизна роботи О.В. Акопової насамперед полягає в розкритті ряду нових, донині не висвітлених в літературі аспектів функціонування МРТР як системи мітохондріального транспорту Ca^{2+} , що регулюється Ca^{2+} та $\Delta\Psi_m$ і приймає участь в регуляції енергозалежних процесів і вільнорадикального метаболізму в мітохондріях. Згідно з ключовою концепцією роботи, регуляторні функції МРТР можуть проявлятися за умов її субмаксимальної активності, за яких поря включається в трансмембранний обмін Ca^{2+} (Ca^{2+} -цикл) і модуляцію мітохондріальної енергетики та процесів, залежних від енергетичного стану мітохондрій. Основними передумовами регуляторних функцій МРТР, за думкою автора, є оборотність функціональних змін в мітохондріях, які не призводять до колапсу їх енергетичного метаболізму.

Викладення експериментальної частини дисертації послідовно і логічно розкриває ключову концепцію роботи. Для розкриття регуляторних функцій МРТР щодо Ca^{2+} -гомеостазу мітохондрій необхідна ідентифікація функціональної ролі МРТР як Ca^{2+} -транспортної системи цих органел. Відповідно, в 4му розділі досліджено роль МРТР в регуляції трансмембранного обміну Ca^{2+} . Досліджено Ca^{2+} - і потенціалзалежну регуляцію активності МРТР як системи

циклоспорин-чутливого транспорту Ca^{2+} , що регулюється Ca^{2+} і $\Delta\Psi_m$. Наступне розкриття ролі МРТР в механізмах трансмембранного обміну Ca^{2+} досягнуто шляхом вивчення спряженого транспорту Ca^{2+} і протону за умов селективного блокування МРТР і Ca^{2+} -уніпортера в енергізованих і деенергізованих мітохондріях. Встановлено, що H^+ -провідність МРТР забезпечує циклоспорин-чутливий вихід Ca^{2+} в обмін на вхід протона, що визначає функціональний аспект МРТР як циклоспорин-чутливого $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -обміну. Це зумовлює важливу фізіологічну роль МРТР як механізму, що забезпечує трансмембранний обмін кальцію, регуляцію Ca^{2+} -ємності і матричного рН.

Біоенергетичні аспекти функціонування МРТР розкрито в 5му та 6му розділах роботи, присвячених дослідженню ролі МРТР в регуляції окисного фосфорилювання і продукції активних форм кисню (АФК). Насамперед, на мітохондріях печінки доведено одночасну участь МРТР і Ca^{2+} -уніпортера в Ca^{2+} -циклі енергізованих мітохондрій і проведено кількісну оцінку вкладу МРТР в Ca^{2+} -цикл, який в свою чергу визначає вклад МРТР в модуляцію показників функціонального стану мітохондрій – дихального контролю, ефективності та швидкості фосфорилювання. Отже, беручи до уваги H^+ -провідність МРТР, автором зроблено висновок, що біоенергетичні ефекти оборотного відкривання МРТР в низькоактивному стані близькі до ефекту «м'якого протонічного роз'єднання» дихального ланцюга.

Із сказаного очевидно, що актуальною проблемою сучасних біомедичних досліджень є пошук шляхів регульованої модуляції активності МРТР. Одним з найефективніших засобів попередження апоптозу шляхом блокування МРТР є феномен ішемічної адаптації (preconditioning), ключову роль в якому відіграють $\text{mitoK}^+_{\text{ATP}}$ -канал і система NO. Однак механізми регуляції активності МРТР під дією фармакологічних активаторів K^+_{ATP} -канала і донорів NO недостатньо вивчені, і тому 7й-9й розділи дисертації присвячені даному питанню.

Зокрема, в 7му-8му розділах роботи О.В. Акопової висвітлено ряд ефективних механізмів підтримання МРТР в станах субмаксимальної активності за умов активації K^+_{ATP} -канала селективним активатором діазоксидом. Встановлено, що одночасна активація K^+ - і Ca^{2+} -циклів мітохондрій призводить до синергізму в пригніченні продукції АФК, який може бути основним механізмом інгібування МРТР за дії активатора K^+_{ATP} -канала.

З'ясування механізмів цитопротекторної дії донорів NO також потребує вивчення ролі NO і АФА в регуляції МРТР. Дослідження впливу донорів NO на активність МРТР в роботі О.В. Акопової проведено за умов як *in vitro*, так і *in vivo*. Вперше показано, що NO є ефективним блокатором МРТР *in vivo*. В свою чергу, блокування пори впливає на метаболізм АФА й АФК. Це відбувається внаслідок модуляції Ca^{2+} -гомеостазу мітохондрій, залежного від активності МРТР.

Роботу завершує заключний розділ, в якому окреслено основні результати власних досліджень автора, підсумовані концептуальною схемою, що висвітлює ключові положення дисертації. Більшість викладених вище результатів власних досліджень О.В. Акопової одержана вперше, також вперше сформульовані основні положення роботи, які визначають її новизну. Зокрема, це кількісна оцінка парціального вкладу МРТР і Ca^{2+} -уніпортера у вивільнення Ca^{2+} з деполяризованих мітохондрій. Також вперше на підставі кількісної оцінки вкладу МРТР в Ca^{2+} -цикл зроблено висновок, що роль відкриття МРТР в станах субмаксимальної активності в модуляції синтезу АТР, як і продукції АФК, залежить від властивостей МРТР як Ca^{2+} -транспортної системи мітохондрій і її вкладу в швидкість дихання і модуляцію $\Delta\Psi_m$. Новим внеском в розуміння механізмів регуляції активності МРТР за активації K^+ _{АТР}-каналу є висновок, що механізм інгібування МРТР включає одночасну активацію трансмембранного обміну K^+ , Ca^{2+} і протону і пригнічення продукції АФК внаслідок роз'єднання дихального ланцюга. Також вперше доведено, що регуляторна функція МРТР за фізіологічних умов спрямована на підтримання низького базального рівня мітохондріального Ca^{2+} і пригнічення вільнорадикальних процесів в мітохондріях. Отже, результатам роботи О.В. Акопової притаманна новизна, і вони становлять не тільки теоретично-пізнавальний інтерес, але й практичну цінність для різних галузей науки – біології, медицини, фармакології, тощо.

Теоретичне і практичне значення результатів роботи. В сучасній літературі переважає підхід до розгляду феномену МРТР як індуктора апоптозу і некрозу клітин. Проте розробка оптимальних методів фармакологічної корекції патологічних станів, обумовлених мітохондріальною дисфункцією потребує адекватного визначення біохімічних механізмів, на яких ґрунтуються регуляторні та патогенетичні аспекти функціонування МРТР. Робота О.В. Акопової є фундаментальним дослідженням іонних мембранних механізмів, які обумовлюють регуляторні функції МРТР в мітохондріях. Автор послідовно проводить думку, що саме регульована модуляція провідності МРТР і її підтримання в станах субмаксимальної активності є найбільш оптимальним шляхом для подальшої розробки засобів фармакологічної корекції розладів серцево-судинної системи і запобігання розвитку захворювань, пов'язаних з мітохондріальною дисфункцією.

Наразі в науці відбувається формування нових, більш адекватних уявлень про фізіологічні функції МРТР в мітохондріях. Тому робота О.В. Акопової має фундаментальне теоретичне значення, оскільки поглиблює розуміння регуляторних функцій МРТР за умов нормальної фізіології на підставі встановлення молекулярних та іонообмінних мембранних процесів, на яких ґрунтуються біоенергетичні ефекти оборотного відкриття МРТР в мітохондріях. В практичному аспекті результати роботи створюють підґрунтя для подальших

біомедичних досліджень в напрямку створення високоефективних фармакологічних препаратів, модуляторів активності МРТР з метою оптимальної фармакологічної корекції мітохондріальної дисфункції за патологічних станів організму.

Роботу О.В. Акопової відзначає нестандартний підхід до вирішення наукових проблем. Оригінальність розв'язання сформульованих автором наукових задач поєднується з ґрунтовністю методологічних засад, на яких базується дослідження. Проте, попри безсумнівну важливість наукових здобутків О.В. Акопової, при ознайомленні з дисертацією виникає ряд запитань та зауважень, переважно, стосовно інтерпретації певних фактичних даних, а саме:

1. Як пояснити позитивні терапевтичні ефекти донорів NO, якщо при їх введенні відбувається гіперпродукція АФК і АФА?

2. Чи спроможна гіперпродукція гідропероксиду створювати захисний ефект для міокарду?

3. В роботі встановлено високий рівень нітрозотіолів після введення нітрогліцерину. Нітрозотіоли можуть блокувати дихальний ланцюг і викликати гіперпродукцію АФК. Чи сумісно це є захисною дією NO?

Зазначенні зауваження не зменшують наукової цінності дисертаційної роботи О.В. Акопової, яка є фундаментальним завершеним науковим дослідженням в галузі біохімії. В роботі представлено результати експериментальних досліджень, які в переважній більшості відзначаються новизною і мають як фундаментальне, так і практичне значення. Оpubліковані наукові праці здобувача (48 наукових робіт, з яких 25 статей в провідних фахових періодичних виданнях, включених до переліку ДАК України, і 23 тези доповідей в матеріалах всеукраїнських і міжнародних наукових конференцій) повністю відображають основні наукові результати дисертації.

За актуальністю, новизною, обґрунтованістю і науковою значимістю основних положень і висновків робота Ольги Валеріївни Акопової повною мірою відповідає вимогам щодо докторських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Завідувач лабораторією молекулярної біохімії
відділу фундаментальних досліджень
ДУ ННЦ «Інститут кардіології
ім. М.Д. Стражеска»



д.м.н. проф. Мхітарян Л.С.