

14 січ 2016

Вх. №

40/03-07/14/16

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу О.В.КОЛОМІЄЦЬ

**«ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН Ca^{2+} В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ
ЗА ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ ТА КАЛІКС[4]АРЕНІВ»**

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.04— біохімія

Актуальність теми.

Подібно до оксидативного стресу, який за обсягом наукових досліджень тепер чітко утримує першість, нітративний стрес – надмірна чи нерегульована продукція радикалу оксиду азоту (NO) або інших активних форм Нітрогену з різноманітними біологічними ефектами, широко представлений в інтересах провідних біологічних та медичних лабораторій. Так само як і для активних форм Оксигену (АФО), ефекти NO та його похідних є двоякими. З одного боку, NO може попереджати окисні пошкодження, а з іншого – шляхом його взаємодії з АФО, може утворюватися пероксинітрит, який виступає основним чинником, що пошкоджує компоненти клітин через різноманітні механізми. Головним ендogenous джерелом АФО в клітині прийнято вважати мітохондрії, здатність котрих генерувати ці форми Оксигену, ймовірно, значно перевищує можливості всіх інших джерел АФО загалом. З іншого боку, мітохондрії відіграють важливу роль в процесах Ca^{2+} -сигналізації, виконуючи функцію високоефективного Ca^{2+} -депо, внаслідок їхньої спроможності акумулювати та вивільняти значні кількості цього катіону. Тому мітохондрії здатні впливати на амплітуду та часові характеристики внутрішньоклітинного Ca^{2+} -сигналу. Саме оксид азоту привертає значну увагу дослідників, як ендogenous сполука, яка є регулятором Ca^{2+} -гомеостазу. Здатність розслабляти гладенькі м'язи зумовлює інтерес до використання донорів цієї сполуки в акушерсько-гінекологічній практиці. Але шляхи реалізації функціональної активності NO в матці вивчено недостатньо, що є актуальною науковою проблемою. Біохімічною основою міорелаксуючого ефекту NO може бути його безпосередній вплив на субклітинні системи транспортування Ca^{2+} в міоциті, наслідком чого є зниження концентрації катіону в міоплазмі і гальмування Ca^{2+} -залежної скоротливої активності міометрія.

Поряд з дослідженнями біохімічних властивостей ендogenous регуляторів транспортування Ca^{2+} в гладеньких м'язах важливим є пошук низькомолекулярних малотоксичних і селективних щодо певних катіон-

транспортувальних систем екзогенних сполук з метою їхнього подальшого застосування як фармакологічних агентів. Протягом останніх років активну увагу дослідників привертають калікс[4]арени – циклічні олігомери фенолу, які володіють широким спектром біологічної активності та мають низьку токсичність. Важливо, що деякі калікс[4]арени виступають ефективними модуляторами субклітинних катіон-транспортувальних протеїнів міоцитів матки. Зазначені речовини є перспективними щодо подальшого дослідження їхнього впливу на Ca^{2+} -транспортувальні системи клітин гладеньких м'язів.

Виходячи із вищесказаного, вважаю, що тема дисертації О.В.КОЛОМІЄЦЬ «ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН Ca^{2+} В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ ЗА ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ ТА КАЛІКС[4]АРЕНІВ» є актуальною і має не лише значний теоретичний, але й практичний інтерес.

Зв'язок теми дисертації з державними чи галузевими програмами.

Робота виконувалась у відповідності до основного плану науково-дослідних робіт відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (зав. – академік НАН України, професор, д.б.н. Костерін С.О.), проблема “Біохімія тварин та людини”: - тема № 5, № 0109U001589 “Вивчення біохімічних механізмів регуляції концентрації іонів Ca в гладеньком'язових клітинах” (I кв. 2009 - IV кв. 2013); - тема № 5, № 0114U003213 “Вивчення біохімічних механізмів спряження збудження та скорочення в гладеньком'язових клітинах” (I кв. 2014 - IV кв. 2018).

Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.

Робота ґрунтується на значному за обсягом експериментальному матеріалі і виконана на високому методичному рівні. Отримані дисертантом результати доповнюють і поглиблюють уявлення про механізм формування внутрішньоклітинного Ca^{2+} -сигналу під дією оксиду азоту - ендогенної сполуки, яка є регулятором Ca^{2+} -гомеостазу. На теперішній час актуальним є пошук та вивчення біохімічних властивостей ендо- та екзогенних речовин, які б спрямовано впливали на активність Ca^{2+} -транспортувальних систем в субклітинних структурах гладеньком'язових клітин, в тому числі і матки. Тому важливими результатами опонованої роботи є доведення того, що Ca^{2+} -чутливий флюоресцентний зонд Fluo-4 AM є перспективним для вивчення змін вмісту Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях міометрія. Із використанням зазначеного флюоресцентного зонду продемонстровано, що процес Mg-ATP^{2-} -залежного транспорту Ca^{2+} в мітохондріях за присутності сукцинату досягає з часом стану рівноваги та характеризується насиченням за субстратом

переносу, константа активації за Ca^{2+} відповідає концентрації іонів Ca у збуджених міоцитах поблизу мітохондрій. Енергозалежна акумуляція Ca^{2+} у мітохондріях ефективно пригнічується рутенієвим червоним, протонофором СССР та олігоміцином.

У даному дослідженні перше показано, що за дії нітросполук - нітропрусиду та нітриту натрію - спостерігається зростання енергозалежної акумуляції Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях міометрія, яке опосередковується активацією саме Ca^{2+} -уніпортера внутрішньої мітохондріальної мембрани.

Із використанням специфічних антитіл проти протеїну Letm1 вперше доведено, що в мітохондріях міометрія саме цей протеїн відповідає за $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмін. Вивчено окремі властивості $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обміну, а саме: кінетика ΔpH -індукованого виходу Ca^{2+} задовольняє реакції першого порядку, функціонування $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінника є зворотним, він активується за фізіологічних значень pH та здійснюється в стехіометрії 1:1. Процесу Na/Ca^{2+} -обміну в мітохондріях міометрія не виявлено. $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінник є нечутливим до дії нітросполук, але стимулюється калікс[4]аренами C-97, C-99 та амілоридом і пригнічується іонами Mg .

Доведена можливість застосування методу лазерної конфокальної мікроскопії та флюоресцентного потенціалчутливого зонду $\text{DiOC}_6(3)$ для візуалізації змін потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів матки. Вперше продемонстровано, що NO зумовлює помірне зменшення трансмембранного мітохондріального потенціалу в клітинах міометрія, тоді як калікс[4]арени C-97 та C-99 викликають транзієнтну поляризацію мітохондріальної мембрани.

Практичне значення одержаних результатів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що одержані дані можуть бути корисними для подальшого пошуку ефективних модуляторів функціональної активності мітохондрій та Ca^{2+} -гомеостазу в ГМК. Зокрема, нітросполуки, що були досліджені, виявилися дієвими ефекторами енергозалежного накопичення іонів Ca в мітохондріях, а калікс[4]арени – системи $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обміну в зазначених субклітинних структурах. Ці результати перспективні для подальшого скринінгу донорів NO та каліксаренів щодо їхнього специфічного, зворотного та афінного впливу на системи трансмембранного обміну Ca^{2+} в мітохондріях ГМК.

Із використанням Ca^{2+} -чутливого флюоресцентного зонду Fluo-4 AM та методів спектрофлюориметрії і протокової цитофлюориметрії розроблено методичний підхід для вивчення змін кількості Ca^{2+} в ізольованих

мітохондріях міометрія. Застосування потенціал-чутливого флюоресцентного зонду DiOC₆(3) та методу конфокальної мікроскопії дозволяє візуалізувати зміни потенціалу мітохондрій інтактних міоцитів матки. Продemonстровано, що із використанням NO-чутливого флюоресцентного індикатора DAF можна легко ідентифікувати місця утворення оксиду азоту в клітині.

Одержані в роботі результати та окремі методичні підходи можна використати як у науковій практиці, так і в навчальному процесі.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях.

Результати проведених автором досліджень викладені у публікаціях. За результатами роботи опубліковано 14 наукових праць, у тому числі - 6 статей у періодичних наукових фахових виданнях та 8 тез доповідей на наукових вітчизняних та міжнародних конференціях.

Зміст автореферату відображає структуру і основні положення дисертації.

Одержані експериментальні дані широко апробовані. Основні наукові положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (м. Севастополь, Україна, 2012), IX Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (м. Севастополь, Україна, 2013), Міжнародній міждисциплінарній науковій конференції «Біологічно активні речовини та матеріали: фундаментальні і прикладні питання отримання і використання» (м. Новий Світ, Україна, 2013), Науковій конференції молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології ” (Київ, Україна, 2013), III Всеукраїнській науковій конференції молодих вчених “Фізіологія: від молекул до організму” (Київ, Україна, 2013), Науковій конференції молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії та біотехнології ” (Київ, Україна, 2014), XI Українському біохімічному Конгресі (Київ, Україна, 2014).

Структура дисертації.

Аналізуючи структуру рецензованої роботи, потрібно відзначити, що вона повністю відповідає вимогам до кандидатських дисертацій. Робота написана логічно, продумано структурована, читається легко.

Дисертаційна робота викладена на 136 сторінках машинописного тексту і складається з таких розділів: «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати та їх обговорення», «Заклучний розділ»,

«Висновки», «Список використаних джерел», який містить 128 посилань. Роботу ілюстровано 42 рисунками та 1 таблицею.

У «**Вступі**» автор обґрунтовує актуальність власного дослідження. Сформульовані завдання повністю відповідають поставленій меті і розкривають її. Перелік положень, які мають наукову новизну та практичне значення, відповідає суті виконаної роботи.

Розділ I «Огляд літератури» складається з 2 підрозділів, у яких містяться фундаментальні відомості про предмет дослідження, необхідні для подальшого кваліфікованого обговорення результатів. Значну увагу приділено біохімічним механізмам регуляції концентрації Ca^{2+} в ГМК, а саме особливостям функціонування систем пасивного та енергозалежного транспорту Ca^{2+} на рівні субклітинних структур, зокрема мітохондрій, а також охарактеризовано ендо- та екзогенні модулятори транспорту Ca^{2+} в ГМК – оксид азоту та калікс[4]арени, їхню біологічну активність.

Розділ II «Матеріали та методи досліджень», свідчить про експериментальну майстерність та професійний рівень дисертанта, яким опановано широкий набір методів. Використано коректні умови постановки експерименту, які дозволяють реалізувати поставлені завдання.

Дослідження проведені на ізольованих мітохондріях та міоцитах матки щурів.

Розділ III «Результати та їх обговорення» складається із трьох логічно структурованих підрозділів. Хочу відзначити такий позитивний момент, що у кінці кожного підрозділу є його узагальнення.

Інтерпретація фактів, отриманих дослідником, є важливим елементом роботи. У даній дисертації їй присвячено «**Заключний розділ**», в якому подається обговорення основних підсумків роботи, яке є кваліфіковане та достатньо аргументоване.

За результатами дисертаційної роботи О. В. КОЛОМІЄЦЬ зроблено 7 **висновків**. Висновки логічно випливають із одержаних даних, науково обґрунтовані, повністю відображають основні етапи і сутність проведеного дослідження.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій.

Сформульовані положення, висновки та рекомендації ґрунтуються на експериментальних даних, одержаних з дотриманням стандартних вимог до утримування тварин, на великій кількості повторностей в експерименті.

Одержані результати піддавали коректному статистичному аналізу. Отже ступінь обґрунтування та достовірності не викликають застереження.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Оцінюючи, в загальному, позитивно рецензовану роботу, у мене до неї є деякі зауваження. Крім того, при читанні роботи виникають питання дискусійного характеру, на які хотілось би почути відповідь автора. Так:

1. Стор.68 - підпункт 3.1.2. має назву : **«Вплив препарату мітохондрій на спектральні характеристики флюоресцентного зонду Fluo-4 AM»**. Після ознайомлення із цією частиною підрозділу 3.1. мені здається, що тут невірно розставлені пріоритети і краще було б назвати його: **«Застосування флюоресцентного зонду Fluo-4 AM для вивчення закономірностей трансмембранного обміну Ca^{2+} в ізольованих мітохондріях гладеньких м'язів»**.

2. На початку висновка 2 сказано: **«Вперше доведено наявність NO в мітохондріях міоцитів матки.....»** Постає питання : Чи утворюється оксид азоту у мітохондріях міометрія, чи він проникає туди із інших компартментів клітини?

Це питання виникає при аналізі дуже цікавих, на мою думку, даних, отриманих при візуалізації окремих ділянок утворення NO в поодинокому міоциті матки із використанням флюоресцентного барвника DAF-FM. У цих експериментах *до міоцитів додавали 0,1 мМ нітропрусиду натрію, донора NO, що призводило до суттєвого зростання (майже у 3 рази) флюоресцентного сигналу (а що тут несподіваного???)*. *Інкубація клітин із зростаючими концентраціями N-нітро-L-аргініна - інгібітора Ca^{2+} -залежних ізоформ NO-синтаз - супроводжувалась дозозалежним зниженням інтенсивності флуоресценції DAF в середньому на 20 % (0,1 мМ N-нітро-L-аргінін) та 40 % (0,2 мМ N-нітро-L-аргінін)*. Був зроблений логічний висновок про те, що: *Ці результати свідчать про специфічність відповіді DAF щодо NO. Є всі підстави вважати, що DAF є оптимальним NO-чутливим флюоресцентним барвником для детекції NO в інтактних міоцитах матки*. Але незавершеність картини полягає в тому, що синтез лише пригнічувався, а не було спроби його стимулювати. Якби була проведена інкубація з L -аргініном – основним субстратом NO-синтази, дані можна було б інтерпретувати ширше і достовірніше.

3. Чи не занадто висока константа активації за кальцієм, визначена для Ca^{2+} -уніпортеру мітохондрій міометрія?
4. При розпаді нітропрусиду натрію утворюються іони Fe та ціанід. Чи не можуть вони впливати на досліджувані вами параметри?

5. Чи можна стверджувати, що ефект калікс[4]аренів пов'язаний саме із замісниками на верхньому та нижньому вінцях каліксаренової чаші?
6. У роботі зустрічаються граматичні і стилістичні помилки, а також невдалі вирази.

Однак, всі зазначені зауваження не зменшують цінності роботи і не впливають на загальну позитивну оцінку. Проблема, яку досліджує автор дисертації, надзвичайно важлива, а одержані нею дані вносять вагомий вклад у з'ясування ролі мітохондрій у контролі Ca^{2+} -гомеостазу в ГМК матки та їхнього значення у забезпеченні спряження між збудженням та скороченням в міометрії. Отримані у роботі дані мають важливе фундаментальне та практичне значення.

Висновок.

Враховуючи все сказане вище, вважаю, що опонована робота «ТРАНСМЕМБРАННИЙ ОБМІН Ca^{2+} В МІТОХОНДРІЯХ МІОМЕТРІЯ ЗА ДІЇ ОКСИДУ АЗОТУ ТА КАЛІКС[4]АРЕНІВ» присвячена важливій науковій і практичній проблемі, є завершеною науковою працею, що за актуальністю проблеми, теоретичним рівнем, методичним забезпеченням, науковою новизною та практичним значенням результатів досліджень відповідає вимогам до кандидатських дисертацій п.п. 11, 12, 13 положення «Порядок присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор, КОЛОМІЄЦЬ ОКСАНА ВАЛЕРІЇВНА, заслуговує присудження їй наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04. – біохімія.

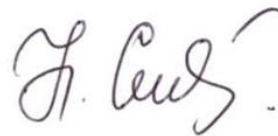
Завідувач кафедри біохімії

Львівського національного університету

імені Івана Франка,

доктор біологічних наук,

професор

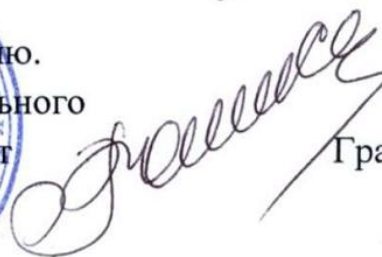


Сибірня Н.О.

Підпис професора Сибірної Н.О. завіряю.

Вчений секретар Львівського національного

Університету імені Івана Франка, доцент



Грабовецька О.С.



