

ВІДГУК

Офіційного опонента на дисертаційну роботу Міщенка Артема Михайловича «Модельне дослідження ролі просторової структури саркомеру в молекулярному механізмі м'язового скорочення», подану до захисту у спеціалізовану вчену раду К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Актуальність роботи

На сьогоднішній день існує багато відомостей стосовно структури саркомеру та його компонентів на мікро-, ультра-, нано- та атомарному рівнях, вивчаються механічні властивості окремих компонентів (скорочувальних білків, титіну). Не дивлячись на значні успіхи в такому різноплановому дослідженні м'язового скорочення, залишаються незрозумілими деякі важливі аспекти роботи м'язів, а саме: молекулярна основа залежності між силою та швидкістю роботи м'язового волокна; молекулярна природа розвитку сили при розтягуванні м'язового волокна, в'язкопружних властивостей активного м'язу, осциляторної, автоколивальної та стрибкоподібної динаміки скорочення, деяких хвороб м'язів, пов'язаних з мутаціями міозину.

Проблеми в дослідженні механізму м'язового скорочення в першу чергу пов'язані з необхідністю поєднувати інформацію, отриману на різних ієрархічних рівнях організації м'яза за допомогою різних експериментальних методик, що потребує системного підходу. М'яз представляє собою складну багатоієрархічну структуру, в якій молекули міозину і актину є складовими квазікристалічної решітки саркомеру. Те, яким чином молекули актину та міозину розташовані в просторі, впливає на їх взаємодію та на роботу м'язу в цілому. Експериментально показано, що завдяки податливості міофіламентів, структура саркомеру не є статичною та може зазнавати змін в ході його роботи. Такі зміни можуть впливати на актоміозинові взаємодії та фізіологічні властивості м'язового волокна в цілому. Просторові обмеження, що накладаються на актоміозинові взаємодії в саркомері, можуть бути чинником, що призводить до появи колективних ефектів в роботі сукупності поперечних

містків. Структурний фактор також може бути важливою складовою, яка визначає певні аспекти зв'язку між мікроскопічним та макроскопічним рівнем.

Головною складністю при експериментальному дослідженні молекулярного механізму є реєстрація колективної роботи множини міозинових моторів в нативній структурі саркомеру. На сьогоднішній день це складно досягти, використовуючи існуючі експериментальні методики. З урахуванням наявності різноманітної інформації, що стосується властивостей окремих компонент саркомеру, перспективним рішенням описаної проблеми є комп'ютерне моделювання. Модель, на відміну від експерименту, дає можливість досліджувати мікроскопічний стан системи. Ще однією перевагою моделі перед експериментом є можливість змінювати систему, що дозволяє з'ясувати функціональну роль тих чи інших її параметрів. У зв'язку із появою потужних комп'ютерів широке розповсюдження отримали просторово розподілені стохастичні моделі що використовують Монте-Карло симуляцію.

У дисертаційній роботі автор досліджує роль структури саркомеру в молекулярному механізмі роботи м'яза при різноманітних режимах його роботи з використанням засобів комп'ютерного моделювання. Зокрема, розглядається модулюючий вплив локальних деформацій структури еластичних міофіламентів на механіку скорочення в ізотонічному, ізометричному та ізокінетичному режимах, аналізується можлива роль просторового розташування в ґратці філаментів, поперечних містків та зв'язувальних центрів в формуванні кооперативних ефектів при роботі міозинових моторів, механізм в'язкопружних властивостей активного м'язового волокна. Дисертант доводить необхідність врахування просторової складової саркомеру для пояснення певних аспектів зв'язку між параметрами циклічної роботи поперечних містків та макроскопічними властивостями м'язової тканини. Отже, робота Міщенко А.М. «Модельне дослідження ролі просторової структури саркомеру в молекулярному механізмі м'язового скорочення» є цілком актуальною, бо дозволяє дати відповіді на цілий ряд питань сучасної біофізики м'язового скорочення.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

Обґрунтованість наукових положень, сформульованих у дисертації, забезпечена адекватністю цілі та завдань, вибором методичних підходів, а також достатнім обсягом досліджень. Всі результати у роботі отримані та проаналізовані автором самостійно, або за його безпосередньої участі, спільно із науковим керівником. Участь Міщенко А.М. та співробітників у виконанні фрагментів роботи детально представлена в авторефераті. В дисертації використовуються імітаційні моделі нанорівня, які деталізують роботу скорочувального апарату на рівні механохімічного стану окремих поперечних містків. Розроблені просторово розподілені моделі відтворюють геометричні обмеження, які накладаються на актоміозинові взаємодії в ґратці міофіламентів, явним чином враховують їх піддатливість, що дозволяє вивчати співвідношення між структурою та функцією. Параметри моделей обрані на основі сучасних експериментальних даних. Моделі реалізовані мовою C++ у вигляді консольного додатку, який може здійснювати паралельні обчислення на багатопроцесорних обчислювальних системах.

Обрані методи дослідження дозволили вирішити поставлені завдання, зробити обґрунтовані висновки з отриманих результатів. Достовірність висновків не викликає сумнівів. Результати роботи в достатній мірі представлені рисунками, які дають чітку уяву про особливості досліджуваних процесів. Автором проведено детальне обговорення положень дисертації із використанням відомостей, що є у сучасній літературі. Отже, наукові положення і висновки дисертаційної роботи є обґрунтованими.

Наукова новизна одержаних результатів

В роботі створена просторово розподілена стохастична модель півсаркомеру з еластичними скорочувальними філаментами, яка дозволяє відтворити експериментально спостережувану механіку розтягування м'язового волокна. Вперше проаналізовано та досліджено механізм впливу еластичності скорочувальних філаментів на швидкість ковзання в ізотонічному режимі,

генерацію сили при ізокінетичному розтягуванні. Проведений детальний аналіз цього впливу в ізотонічному режимі шляхом аналізу статистики змін довжини півсаркомеру, що викликаються окремими механохімічними переходами поперечних містків.

Вперше детально проаналізована важливість дискретності ґратки філаментів як одного з факторів формування колективних ефектів в роботі поперечних містків. Розроблена модель дозволила отримати стрибкоподібний режим скорочення півсаркомеру, аналогічний до експериментального. Було здійснене кількісне порівняння результатів моделі та експерименту. Знайдений кількісний зв'язок параметрів стрибкоподібного руху з геометричними параметрами ґратки півсаркомеру, а саме, періодичністю розташування поперечних містків та зв'язувальних центрів на товстих та тонких філаментах відповідно. Проаналізований механізм формування сходинок, в декілька разів більших за елементарну.

Вперше розроблена чисельна процедура, що апроксимує рішення стохастичної просторово-розподіленої моделі півсаркомеру з дискретним розташуванням поперечних містків та зв'язувальних центрів в ґратці філаментів для випадку великої кількості поперечних містків.

Дисертантом отримано ряд моделей, що відтворюють в'язкопружну поведінку активного скелетного м'язового волокна. Вперше зроблена інтерпретація походження експоненційних процесів (A), (B) і (C) та їх параметрів в термінах просторово-часової динаміки країв розподілів зв'язаних поперечних містків. Показано, що експоненційні процеси є наслідком крайових ефектів, які виникають на межі суміжних ділянок з різним рівнем щільності, розподілів зв'язаних поперечних містків. Зокрема показано, що експоненційний процес (B), який відповідає за здатність поперечносмугастих м'язів працювати в осциляторному режимі, пов'язаний з відновленням до ізометричної форми лівих країв розподілів поперечних містків в сильнозв'язаних силогенеруючих станах. У дисертації показана необхідність врахування просторової складової скорочувального апарату для реалізації певних аспектів запропонованого

механізму в'язкопружних властивостей, обмеження редукованих кінетичних моделей реалізувати такий механізм.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Робота виконана на високому науковому та методичному рівнях. В результаті проведених досліджень автором встановлено достатню кількість нових фактів, важливих для розвитку сучасних уявлень про молекулярний механізм м'язового скорочення та розуміння природи в'язкопружних властивостей м'язових волокон.

Результати отримані автором можуть в подальшому виступати теоретико-методологічним підґрунтям для інших наукових робіт в цьому напрямку. Розуміння зв'язку між змінами механохімічних властивостей окремих компонент саркомеру та механічними закономірностями його роботи є важливими з точки зору інтерпретації та аналізу експериментальних даних, розуміння природи хвороб, пов'язаних з м'язами. Створені моделі можуть використовуватись для кількісної оцінки такої залежності.

Матеріали дисертації впроваджені у навчальному процесі кафедри біофізики Донецького національного університету ім. В. Стуса.

Повнота викладу результатів у наукових публікаціях

Одержані експериментальні дані достатньо висвітлені у наукових статтях, зокрема у таких фахових виданнях України: «Фізика живого», 2008; «Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону», 2011; «Вісник Донецького Національного Університету, Сер. А: Природничі науки», 2012; «Вісник Львівського університету. Серія біологічна» 2017; та у закордонному журналі, який індексується у наукометричній базі Scopus «Gen Physiol Biophys». 2018.

Основні наукові положення дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на: I Українській науковій конференції, Харків: ХНУ ім. Каразіна, 20-22 вересня 2004. Харків; IV з'їзді Українського біофізичного товариства, Донецьк: ДонНУ, 19-21 грудня 2006; IV Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів, Львів, 7-10 квітня 2008; International Conference «NANOBIOPHYSICS: fundamental and applied aspects», Харків:

ФТІНТ, 5-8 Жовтня 2009; V з'їзді Українського біофізичного товариства, Луцьк-Світязь, 22-25 червня 2011; 2nd International Conference on Biomedical Sciences "Smart Bio", Lithuania, Kaunas, 3 May 2018; XIII Міжнародній конференції по прикладній біофізиці, біоніці та біокібернетиці, Київ, 18-20 жовтня.

Аналіз структури і змісту дисертації

Дисертація чітко структурована, що в цілому сприяє цілісному розумінню окремих фрагментів роботи, написана грамотно. Застосована в роботі наукова термінологія є загально визнаною, стиль викладення результатів досліджень, наукових положень, висновків і рекомендацій забезпечує доступність їхнього сприйняття та використання.

Дисертаційна робота Міщенко А.М. структурно повністю відповідає вимогам ДАК України і включає всі відповідні розділи. Дисертація складається з анотації, переліку умовних позначень, вступу, 7 основних розділів, висновків, списку використаних джерел, який налічує 165 найменування, та додатків. Загальний обсяг дисертації - 222 сторінок. Дисертація містить 72 рисунки і 21 таблицю.

У «Вступі» розкрито актуальність теми, сформульовані мета та завдання дослідження, представлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів. Крім цього приведено загальну кількість публікацій, описана структура та обсяг дисертації.

Літературний огляд. Цей розділ містить глибокий аналіз наявних літературних наукових даних, належним чином висвітлює стан вибраної дисертантом проблематики, написаний логічно і послідовно, що свідчить про здатність автора до критичного осмислення і теоретичного узагальнення різномірних даних. У літературному огляді розглядаються експериментальні та теоретичні відомості про:

- величину жорсткості скорочувальних філаментів, її фізіологічне значення,
- механіку ізокінетичного розтягування м'яза,

- просторову структуру ґратки саркомеру, взаємозв'язок між структурою та функцією,
- механіку стрибкоподібних змін довжини саркомерів, механізм цього явища,
- перехідні та частотні характеристики активного м'язового волокна, їх фізіологічне значення, наявні уявлення про їх природу.

У розділі 2 описані чисельні та математичні методи, що використовувались для побудови моделей, їх чисельної реалізації, симуляції різноманітних експериментальних режимів роботи м'язу, обробки результатів симуляції.

У розділі 3 описується просторово розподілена стохастична модель півсаркомеру з еластичними скорочувальними філаментами, яка була побудована в рамках підходу, запропонованого Daniel, Trimble et al. 1998. Описуються способи реалізації в рамках даної моделі симуляції експериментів з ізотонічного та ізометричного скорочення.

У розділі 4 аналізується вплив еластичності скорочувальних філаментів на механіку роботи півсаркомеру в стаціонарних та нестаціонарних режимах. Міщенко А.М. показує, що цей вплив має «пасивну» складову, обумовлену загальною зміною еластичності півсаркомеру, а також «активну» складову, пов'язану з появою локальних деформацій структури ґратки скорочувальних філаментів. Такі деформації впливають на циклічну роботу поперечних містків, їх здатність виконувати механічну роботу та колективні ефекти в роботі їх сукупності. В ізотонічному режимі це зменшує ізометричну силу та швидкість розтягування завдяки зміні частоти механохімічних переходів та кількості змін довжини півсаркомеру певного напрямку на одиницю часу, що ними викликаються. Показано, що під час ізометричної активації та ізокінетичного розтягування зміни кінетики актоміозинових взаємодій впливають на перехідні процеси виходу сили на стаціонарний рівень, уповільнюючи їх.

У розділі 5 досліджуються колективні ефекти в роботі сукупності поперечних містків, що виникають в дискретній ґратці філаментів. В рамках

стохастичної моделі дисертантом отримано стрибкоподібну динаміку змін довжини півсаркомеру в ізотонічних умовах. Ця динаміка має значну якісну схожість з аналогічною динамікою, що спостерігають в експерименті. Зокрема, аналогічно до експерименту, гістограми сходинок мають полімодальний характер. Міщенко А.М. з'ясовано, що сходинки траєкторії є результатом синхронізації роботи окремих поперечних містків. Показано, що важливим чинником такої синхронізації є дискретність розташування поперечних містків та зв'язувальних центрів у ґратці філаментів. Знайдено кількісне співвідношення між геометричними параметрами ґратки філаментів та величиною сходинок.

У *Розділі 6* описаний підхід, що дозволяє отримати модель, яка є детерміністичною апроксимацією стохастичної просторово розподіленої моделі пари скорочувальних філаментів. В рамках запропонованого підходу було побудовано ряд моделей, що апроксимують стохастичні моделі. Детерміністичні моделі дозволили більш систематично дослідити явище східчастого скорочення в ізотонічному режимі, отримати сходинки, величина яких співпадає з експериментальною. Міщенко А.М. показує важливу роль шуму, пов'язаного з випадковістю механохімічних переходів поперечних містків в механізмі формування сходинок, що в декілька разів більші за елементарну. В роботі робиться висновок, що спостережувана в експерименті динаміка не може бути пояснена тільки лише на основі кооперативних ефектів, обумовлених структурними обмеженнями дискретної ґратки.

У *розділі 7* описані детерміністичні просторово розподілені моделі півсаркомеру, що відтворюють в'язкопружні властивості активного м'язового волокна кролика. В рамках моделей були отримані силові відгуки півсаркомеру на східчасті та гармонійні зміни довжини. Зроблений аналіз просторово часової динаміки розподілів поперечних містків в зв'язаних станах свідчить, що експоненційні процеси (А), (В) та (С) є наслідком крайових ефектів, які виникають на межі суміжних ділянок з різним рівнем щільності розподілів кількості зв'язаних поперечних містків. Показано, що динаміка експоненційних

процесів пов'язана з динамікою відновлення крайових ділянок, збурених змінами довжини. Показана важливість просторової складової в реалізації механізму спостережуваних в'язкопружних властивостей та обмеження редукованих кінетичних моделей реалізувати такий механізм.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації

Не зважаючи на достатньо ретельний і відповідний вимогам рівень оформлення дисертації і автореферату, слід вказати деякі зауваження до роботи:

1. У вступі, зокрема у пункті «Актуальність» подано опис структури роботи по розділах. Вважаю не доцільним наводити дану інформацію у цьому розділі.

2. Слід було б більш точно сформулювати «Об'єкт дослідження», він в деякій мірі дублює «Предмет» і занадто деталізований.

3. У дослідженнях обрана модель, описана в роботах Daniel, Trimble et al. 1998. Автором роботи не обгрунтовано, чому саме ця модель була обрана, її переваги перед іншими моделями, що враховують наявність еластичності скоротливих філаментів м'язів. Які переваги має обрана вами модель?

4. Хотілося б почути, наскільки розроблена вами модель, наближена до природніх моделей.

5. Є зауваження до вживання деяких термінів, зокрема: багаторазово вживається термін «біофізичний механізм». Вважаю, що механізм – це єдине явище, але воно розглядається із різних аспектів, зокрема і біофізичного. Чи коректно вжиті терміни «ковзання півсаркомеру», «розсинхронізація роботи», «релаксація сили», «конформаційні зміни міозинової головки».

6. У мові дисертації зустрічаються русизми, тавтології, усунення яких би значно спростило сприйняття матеріалу дисертації.

Однак, треба зазначити, що зроблені зауваження, побажання і запитання а також наявні в тексті нечисленні помилки та повторювання не применшують значимості дисертаційного дослідження. У цілому кандидатська дисертація Міщенко А.М. на тему: «Модельне дослідження ролі просторової структури

саркомеру в молекулярному механізмі м'язового скорочення», є завершеною науковою працею, в якій отримано результати, що в сукупності вирішують поставлену проблему.

Узагальнення та висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам

Виходячи із зазначеного, кандидатська дисертація Міщенка Артема Михайловича «Модельне дослідження ролі просторової структури саркомеру в молекулярному механізмі м'язового скорочення» є завершеним і актуальним дослідженням. При виконанні цієї роботи дисертантом із застосуванням адекватних сучасних методів були одержані нові оригінальні результати, які є важливими як у теоретичному, так і в практичному аспектах науки, спорту, медицини. Тому вважаю, що дисертаційна робота Міщенка А. М. «Модельне дослідження ролі просторової структури саркомеру в молекулярному механізмі м'язового скорочення» цілком відповідає вимогам п.п.9,11,12,13 «Порядку присудження наукових ступенів затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 р.(зі змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України №656 від 19.08.2015р., №1159 від 0.12 2015р. та № 567 від 27.07.2016 р.), що висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.02 – біофізика

Офіційний опонент:

Кандидат біологічних наук,

доцент кафедри фізіології людини і тварин,

Східноєвропейського національного університету

імені Лесі Українки

Мотузюк О.П. Мотузюк

