

ВІДГУК

Офіційного опонента на дисертаційну роботу Міщенко Артема Михайловича
«Модельне дослідження ролі просторової структури саркомеру в
молекулярному механізмі м'язового скорочення», на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність роботи

Концепція взаємозв'язку та взаємодії структури та функції знаходить широке застосування в дослідженні біологічних систем. Зокрема, це стосується й досліджень природи м'язового скорочення. Механічні закономірності роботи м'язового волокна визначаються не тільки механохімічними властивостями молекул міозину та актину, важливе значення має те, як ці молекули організовані в просторі. У поперечносмугастих м'язах молекули актину та міозину входять до складу складної трьохвимірної ґратки міофіламентів саркомеру. Ґратка саркомеру модулює біохімічну взаємодію молекул актину та міозину, створюючи їх просторову неоднорідність. Ґратка саркомеру механічно поєднує молекули актину та міозину між собою, як результат, міозинові мотори не діють незалежно, у їх роботі виникають кооперативні ефекти. Багато аспектів взаємозв'язку між структурою саркомеру та механічними закономірностями роботи м'язового волокна залишаються не розв'язаними. Розуміння цього зв'язку є важливим, як із практичної, так і теоретичної точки зору. Актуальним підходом для вивчення ролі структури є моделювання з використанням сучасних просторово розподілених моделей, які дозволяють адекватно передати взаємовідносини структури та функції, що є характерними для реального саркомеру. Це дає можливість вивчати природу фізіологічних властивостей складних багатоієрархічних біологічних систем, де сучасні експериментальні методи можуть мати тільки обмежені можливості. У дисертаційній роботі А.М. Міщенко, з використанням засобів математичного моделювання була досліджена роль просторової структури ґратки саркомеру в молекулярному механізмі роботи м'язу. Задачі, що розв'язувались у роботі, розкривають роль структурного фактору з погляду його здатності впливати на

актоміозинові взаємодії; формувати колективні ефекти в роботі поперечних містків; бути необхідною складовою макроскопічних закономірностей роботи м'язу, створюючи просторову розподіленість властивостей ансамблю поперечних містків. Ще одним напрямком роботи була розробка підходу для створення просторово розподілених моделей скорочувального апарату м'язів.

Виходячи з наведеного, актуальність представленої роботи не викликає сумнівів.

Наукова новизна одержаних результатів

Показано, як невеликі локальні механічні зміни структури ґратки еластичних міофіламентів, що виникають за фізіологічних умов роботи м'язу, здатні впливати на актоміозинові взаємодії. На відміну від попередніх робіт, у роботі Міщенко А.М. було використано модель, що дозволяє відтворити експериментально спостережувані закономірності механіки розтягування м'язу; розглянуто ряд режимів роботи півсаркомеру, симуляція яких раніше не проводилась у подібних моделях. Уперше, проведено детальний аналіз механізму впливу локальних деформацій скорочувальних філаментів на кінетику та механіку роботи поперечних містків в ізотонічному режимі. Показано, що локальні деформації ґратки філаментів можуть впливати на колективну поведінку поперечних містків, що пов'язана з дискретністю їх розташування, породжуючи ефекти (відсутність овершуту та коливань сили), аналогічні тим, що зазвичай приписують порушенням латеральної симетрії ґратки філаментів саркомеру внаслідок флуктуацій їх розташування, або неоднорідності сукупності послідовно з'єднаних довжин саркомерів м'язового волокна.

У роботі проаналізовані колективні ефекти в роботі ансамблю поперечних містків, що пов'язані з дискретністю ґратки філаментів. Вперше знайдено кількісне співвідношення між параметрами східчастих змін довжини півсаркомеру в ізометричному режимі та геометричним параметрами ґратки

філаментів. Уперше проведене кількісне порівняння явища східчастих змін довжини саркомеру в моделі та експерименті.

Уперше була розроблена детерміністична апроксимація стохастичної просторово розподіленої моделі пари скорочувальних філаментів, що використовує Монте-Карло симуляцію.

У рамках створених моделей, що відтворюють в'язкопружну механіку активного м'язового волокна, була здійснена симуляція східчастих та гармонійних змін довжини півсаркомеру. На основі аналізу просторово-часової динаміки розподілів поперечних містків, що виникають внаслідок збурень довжини, було знайдено низку важливих закономірностей, що стосуються ролі просторової складової в реалізації механізму в'язкопружних характеристик. Уперше показано, що в'язкопружні властивості та їх параметри пов'язані з крайовими ефектами, що виникають на межі суміжних ділянок розподілів зв'язаних поперечних містків із різним рівнем заселеності. Показано, що важливу роль у запропонованому механізмі відіграє просторова розподіленість властивостей ансамблю поперечних містків, також показана обмеженість деяких існуючих редукованих моделей, які розглядають усереднені властивості за ансамблем, відтворити такий механізм.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження

Вивчення ролі модулюючого впливу локальних деформацій еластичних скорочувальних філаментів на кінетику актоміозинових взаємодій, механічні закономірності роботи м'язу, повинні враховуватись у разі інтерпретації деяких експериментальних досліджень на м'язових волокнах чи міофібрилах, які інтерпретують отримані результати в термінах механохімічних властивостей окремих поперечних містків. Створені моделі можуть бути використані для кількісної оцінки цього модулюючого впливу.

Розуміння зв'язку між змінами механохімічних властивостей окремих компонент саркомеру та механічними закономірностями його роботи є важливою з погляду розробки ліків, дія яких спрямована на молекули міозину

II, розуміння природи хвороб, пов'язаних із м'язами, що викликаються мутаціями, які міняють механічні властивості моторних чи структурних білків саркомеру.

Розроблений підхід для створення детерміністичних просторово розподілених моделей півсаркомеру може бути використаний у якості швидкодійної альтернативи до стохастичних просторово розподілених моделей, що використовують метод Монте-Карло, в якості чисельної апроксимації кінетичних моделей, що засновані на диференційних рівняннях у частинних похідних.

Знайдені в роботі узагальнення, які стосуються природи в'язкопружних властивостей активного м'язового волокна та ролі просторової складової в цьому механізмі, можуть бути використані для подальшого вивчення цього явища, зокрема, можуть розглядатись як обмеження, що мають бути враховані у разі створення просторово-редукованих моделей.

Матеріали дисертації були впроваджені в навчальний процес кафедри біофізики Донецького національного університету ім. В. Стуса.

Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації

У роботі були використані сучасні підходи до моделювання скорочувального апарату м'язу, які беручи до уваги дискретність взаємного розташування в ґратці саркомеру індивідуальних міозинових голівок та зв'язувальних сайтів на актині, дозволяють отримати інформацію, що стосується зв'язку між структурою та функцією. Параметри моделей обирались із використанням сучасних експериментальних даних. Використані способи аналізу результатів симуляції є логічно обґрунтованими. Статистичні методи, що використовувались для обробки результатів стохастичної моделі, відповідають типу, розподілу даних, об'єму вибірки. Автоматична детекція та вимірювання висот сходинок в стохастичній траєкторії змін довжини півсаркомеру здійснювалась за допомогою двох методів: методу, що був

розроблений автором та використовує вейвлет аналіз, і процедури, запозиченої в роботі (Little, Steel et al. 2011). Обидві процедури дали аналогічні результати. Обрані коректні чисельні методи для чисельного розв'язку жорсткої системи звичайних диференціальних рівнянь у детерміністичній моделі.

Одержані результати добре проаналізовані, порівнюються з даними інших дослідників, це дає підставу стверджувати про достатній ступінь обґрунтованості основних положень, сформованих у дисертації, їх достовірність.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.
Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт кафедри біофізики біологічного факультету Донецького національного університету імені Василя Стуса.

Повнота викладення наукових положень, висновків і рекомендацій дисертації в опублікованих працях

Основні результати досліджень проведених у дисертаційній роботі опубліковані у 4 фахових виданнях із біологічних наук, що входять до переліку МОН України, та 1 виданні що належить до наукометричної бази даних Scopus. Основні положення дисертації широко апробовані на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Кількість публікацій, обсяг, якість, повнота висвітлення результатів та розкриття змісту дисертації відповідає чинним вимогам МОН України.

Вважаємо, що дисертація пройшла належну апробацію; вона є самостійною науковою працею, що має завершений характер.

Структура дисертації

Дисертація викладена на 222 сторінках. Складається зі вступу, семи основних розділів, висновків, списку використаних джерел (165 найменувань) та трьох додатків.

Дисертаційна робота Міщенко А.М. структурно повністю відповідає вимогам ДАК України

У «Вступі» розкрито актуальність теми, сформульовані мета та завдання дослідження, представлено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів. Крім цього висвітлено особистий внесок здобувача, апробацію, публікацію та впровадження матеріалів дослідження.

У **розділі 1** «Огляд літератури» наводиться глибокий аналіз наявних літературних наукових даних, що стосуються вибраної дисертантом проблематики та використовуються в подальшій роботі при побудові моделей, порівнянні їх результатів з експериментом, обговоренні отриманих результатів. Здобувач розкриває існуючі експериментальні дані, які стосуються механічних властивостей міофіламентів, геометрії їх ґратки в саркомері, відомості про фізіологічне значення цих властивостей. Наводить експериментальні відомості, що стосуються механіки розтягування поперечно смугастих м'язів, їх в'язкопружних властивостей, відомості про їх природу спостережуваних закономірностей.

У **розділі 2** «Матеріали та методи» описані чисельні та математичні методи, що використовувались у разі побудови моделей, створенні їх програмних реалізацій, обробці результатів обчислювальних експериментів. Також наводяться методи перерахунку, що дозволяють зіставляти результати, отримані в рамках моделі, та експериментальні результати.

У **розділі 3** описується просторово розподілена стохастична модель півсаркомеру. Розроблена модель була створена в рамках підходу, запропонованого в роботі (Daniel, Trimble et al. 1998), це дозволило явним чином врахувати наявність еластичності скорочувальних філаментів, врахувати структурні обмеження, що накладаються на взаємодію актину та міозину в саркомері. Функції швидкостей кінетики переходів між станами поперечного містка були створені на основі роботи (Getz, Cooke et al. 1998), завдяки цьому модель була здатна відтворювати механічні закономірності розтягування

м'язового волокна. Описані способи реалізації в моделі чисельних експериментів з ізокінетичного та ізотонічного скорочення півсаркомеру.

У розділі 4 представлені результати чисельних експериментів, проведених у рамках стохастичної моделі роботи півсаркомеру в стаціонарних та нестаціонарних режимах. Аналізується, яким чином еластичність скорочувальних філаментів впливає на механіку роботи півсаркомеру в цих режимах. В ізотонічному режимі наявність еластичності значним чином змінювало ексцентричну частину залежності швидкість-сила, збільшення еластичності зменшувало ізометричну силу та збільшувало швидкість розтягування. У роботі проведений детальний аналіз причин такого впливу, показано, що під час роботи саркомеру еластичні філаменти піддаються незначним деформаціям. Зміни регулярності структури еластичних філаментів впливають на кінетику актоміозинових взаємодій. Показаний вплив наявності еластичності на динаміку силового відгуку у разі ізокінетичного розтягування, динаміку зростання сили у разі ізометричної активації. Локальні деформації скорочувальних філаментів змінюють швидкість виходу сили на ізометричний рівень, змінюючи характерну швидкість перехідного процесу; впливають на синхронізацію роботи поперечних містків, що пов'язана з дискретністю ґратки міофіламентів. В обговоренні результатів зазначається, що отримані данні мають враховуватись у разі інтерпретації деяких експериментальних досліджень, які використовуються для прямої оцінки констант швидкостей переходів в механохімічному циклі містків. Результати зіставляються з наявними експериментальними та теоретичними даними.

У розділі 5 розглядається дискретність ґратки філаментів як чинника, що формує колективні ефекти в роботі сукупності поперечних містків. У стохастичній моделі були отримані східчасті зміни довжини півсаркомеру в ізотонічному режимі. Як показано в роботі, це явище має значну якісну схожість з аналогічним явищем, що спостерігають в експерименті. Східчаста динаміка змін довжини виникає завдяки синхронізації роботи окремих поперечних містків. Показано, що ключовим чинником цієї синхронізації є

дискретність ґратки півсаркомеру. Знайдено кількісне співвідношення між розташування поперечних містків на товстому філаменті та зв'язувальних центрів на тонкому і величиною сходинок.

У розділі 6 описана детерміністична апроксимація стохастичної моделі, у якій розглядається взаємодія пари жорстких скорочувальних філаментів. Підґрунтям для створення апроксимації була дискретність відстаней між поперечними містками та зв'язувальним центрами в стохастичній моделі, завдяки чому поперечні містки можна розділити на групи за їх деформацією та розглядати стан кожної статистично, використовуючи звичайні диференціальні рівняння. Перевагою детерміністичної процедури є те, що вона потребує менших обчислювальних ресурсів, оперує середніми.

Порівняння результатів симуляції ізотонічного скорочення в стохастичних моделях, що використовують Монте-Карло симуляцію, та відповідних їм детерміністичних моделях, показало валідність апроксимації для випадку великої кількості поперечних містків. Також показано можливість застосування запропонованого підходу для апроксимації рішень безперервних моделей, що засновані на формалізмі Хакслі. Перевагою порівняно із наявними чисельними методами є його більша чисельна стабільність.

З використанням детерміністичних моделей, було більш систематично розглянуто механізм та необхідні умови для виникнення східчастих змін довжини в ізотонічному відгуку, зв'язок їх характеристик із геометричними параметрами ґратки філаментів.

У розділі 7 описані створені в роботі моделі, що відтворюють в'язкопружну поведінку активного м'язового волокна скелетного м'язу кролика. Моделі було побудовано в рамках підходу, описаного в розділі 6, з застосуванням методів оптимізації. Обмеження для діапазонів варіювання параметрів моделі були обрані на основі експериментальних даних. На основі аналізу просторово-часової динаміки розподілів зв'язаних поперечних містків, що були викликані збуреннями довжини півсаркомеру малої амплітуди, було запропоновано механізм в'язкопружних властивостей. В'язкопружні

властивості у разі малих (~ 1 Гц) та великих (~ 100 Гц) частот гармонійних змін довжини пов'язані з динамікою правих крайових ділянок розподілів поперечних містків в слабозв'язаних та/чи сильнозв'язаних станах; на середніх частотах (~ 10 Гц) із лівими крайовими ділянками розподілів поперечних містків у сильнозв'язаних станах. Показана важливість врахування у моделі просторової складової для відтворення запропонованого механізму. Наводяться приклади існуючих у літературі редукованих кінетичних моделей, які завдяки цьому відтворюють в'язкопружні властивості лише частково.

Треба зазначити, що в кінці кожного експериментального розділу автор логічно і ретельно узагальнює та аналізує отримані ним результати.

За результатами дисертаційної роботи зроблено 6 узагальнюючих висновків, які логічно випливають із одержаних результатів, науково обґрунтовані, повністю відображають основні етапи і сутність проведеного дослідження.

Зміст автореферату відповідає основним положенням дисертації.

Окремі дискусійні питання і зауваження до дисертації.

Під час розгляду дисертаційної роботи виникла необхідність зробити ряд зауважень і пропозицій.

1. В огляді літератури, де ретельно описані існуючі механокінетичні параметри скорочення, доцільно було б навести сучасні дані про молекулярну основу місткової гіпотези генерації сили, оскільки молекулярні механізми функціонування скоротливого апарату є суттєвими для моделювання скорочення м'язу.
2. При описанні моделей, з моєї точки зору, треба більш ретельно зазначати, чим відрізняються запропоновані автором моделі від вже існуючих (які параметри і характеристики вводяться в модель вперше) і як це дозволяє зрозуміти механізм м'язового скорочення.

3. В списку використаних джерел, на жаль, зустрічається велика кількість статей, опублікованих до 2000 року.
4. На мій погляд, перший висновок носить констатаційний характер і не описує переваги запропонованої моделі.
5. В деяких таблицях (наприклад, 7.9, 7.12) використовуються скорочення, що розшифровуються тільки в тексті дисертації, що ускладнює їх сприйняття.
6. Враховуючи теоретичний характер дослідження, хотілося б знати, як отримані результати можна використати для пояснення молекулярного механізму м'язового скорочення.
7. Треба зазначити, що для розуміння молекулярних механізмів м'язового скорочення моделювання становить істотну частину досліджень. Однак, критерієм адекватності моделі служить ступінь збігу опису макроскопічних властивостей м'язу в моделі з експериментальними результатами. В представленій роботі наведені результати тільки модельних досліджень. Тому хотілось би побажати автору зробити експериментальну перевірку запропонованих моделей.

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 Артема Михайловича «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.

Висновок.

Виходячи із зазначеного, кандидатська дисертація Міщенко А.М. 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.

Тому вважаю, що дисертаційна робота Міщенко Артема Михайловича «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 30.12 2015р. та № 567 від 27.07.2016 р.) , що висувуються до кандидатських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

доцент кафедри біофізики та медичної інформатики
 ННЦ «Інститут біології та медицини»
 Київського національного університету
 імені Тараса Шевченка,
 доктор біологічних наук, ст.н.с.



Н.Є. Нурищенко



