

ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертацію Мазур Галини Михайлівни
**«ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ КРИТЕРІЇВ
АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ»**

представлену на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.02 - біофізика

В клітинах мітохондрії виконують широкий спектр функцій: біоенергетика (окисне фосфорилування, синтез АТФ), місце перебігу універсальних метаболічних процесів (енергетичний метаболізм, частина реакцій циклу сечовини, джерело активних форм кисню, регуляція апоптозу/некрозу, цілий ряд спеціалізованих (синтез стероїдних гормонів), підтримання внутрішньоклітинного Ca^{2+} -гомеостаза (є високоемнісним Ca^{2+} -депо, здатні термінувати Ca^{2+} -сигнал та підтримувати низьку фізіологічно-значущу концентрацію цього катіона в цитозолі, захищаючи клітини від Ca^{2+} -перевантаження). Всі перелічені функції обумовлюють ключову роль цих органел для нормальної життєдіяльності клітин. Фізіологічна роль іонів Са в органелах обумовлена їхнім значенням в регуляції фундаментальних біологічних процесів, які в них протікають. Зростання концентрації Ca^{2+} в клітині за її активації зовнішніми стимулами супроводжується зростанням інтенсивності протікання АТФ-залежних реакцій та відповідно збільшенням споживання АТФ. У мітохондріях Ca^{2+} стимулює окисне фосфорилування та продукцію АТФ шляхом активації піруватдегідрогеназного комплексу та ензимів циклу Кребса, що забезпечує надходження відновлених еквівалентів NADH до електронно-транспортного ланцюга. Але надмірне надходження Ca^{2+} у мітохондрії та стимулювання функціонування дихального ланцюга є основним механізмом надмірної продукції активних форм кисню.

Печінка в організмі виконує жовчосекреторну, депонуючу, дезінтоксикаційну, екскреторну та терморегуляційну функції. В ній відбувається синтез компонентів системи зсідання крові та інактивація багатьох біологічно активних речовин. Перевантаження печінки, зокрема жирною їжею, алкоголем, ліками, призводить до посилення енергетичних процесів в клітинах

печінки, а саме мітохондрійного дихання. Інтенсивність мітохондрійного дихання є важливим показником життєздатності клітини, яка корелює із здатністю мітохондрій забезпечувати енергетичні потреби, зокрема і у випадку навантаження або стресу. Посилення споживання кисню можна розглядати захисним механізмом і охарактеризувати як адаптаційну здатність мітохондрій. Є дані, що її зниження в ізольованих мітохондріях корелює з різними патологіями (захворювання серцево-судинної системи та нейродегенеративні процеси) й загибеллю клітин. Розробка критеріїв оцінки адаптаційної здатності мітохондрій, дослідження факторів, які впливають на неї, є важливою проблемою біофізики, біохімії та молекулярної фізіології, а в практичному аспекті може бути корисним для її корекції та фармакотерапії.

Отже, мета роботи **Мазур Галини Михайлівни**, а саме – експериментально обґрунтувати критерії адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів за окислення різних субстратів, впливу високих концентрацій Ca^{2+} та дії етанолу, є сучасною і актуальною.

Рукопис оформлено згідно існуючих вимог за класичним зразком. У вступній частині дисертантка зупинилася на актуальності обраної теми, акцентувавши увагу на невирішених питаннях щодо оцінки енергетичного потенціалу мітохондрій гепатоцитів, їхньої адаптаційної здатності, за умови деполяризації внутрішньої мембрани органел в присутності протоніофорів, доступності субстратів окиснення та Ca^{2+} . Мета та задачі роботи сформульовані грамотно; наголошується на науковій новизні та практичному значенні одержаних результатів. В огляді літератури, увага зосереджена на обґрунтуванні терміну “адаптаційна здатність мітохондрій” та біофізикохімічних процесах, які її забезпечують. Зокрема, описано біологічну роль циклу трикарбонних кислот та системи транспортування його субстратів, структуру електронно-транспортного ланцюга, роль NAD- та FAD-залежних дегідрогеназ. Увагу приділено ролі іонів Ca та функціональній активності пори перехідної провідності (mPTP) у регуляції клітинного дихання. У зв’язку з тим, що печінка є основним органом, який метаболізує алкоголь, дисертантка

зупинилась на шляхах його метаболізму в печінці та механізмах токсичного впливу на гепатоцити.

В «Матеріалах та методах досліджень» достатньо повно описуються методики, використані для досягнення поставлених задач. Мазур Г.М. використала адекватні методи та підходи, для вирішення мети дисертаційної роботи, а саме біофізичні, фізико-хімічні, фізіологічні та статистичні, що зробило висновки з представленої роботи цілком обґрунтованими.

Послідуючі розділи присвячено результатам експериментальних досліджень у відповідності із метою і основними завданнями дисертаційної роботи. Доречними є підсумки в кінці кожного розділу, які дозволяють систематизувати одержані результати та обґрунтувати доцільність послідувочої експериментальної роботи, а також заключний розділ, де наводяться узагальнення одержаних результатів і їхній аналіз із використанням даних літератури. Закінчують рукопис висновки, список використаних джерел, а також додаток із списком опублікованих праць за темою дисертації.

Мазур Г.М. в ході виконання дисертаційної роботи обґрунтувала та експериментально довела можливість оцінки адаптаційної здатності мітохондрій печінки за максимальною швидкістю роз'єданого дихання в присутності протонофора FCCP, яка залежить від наявності субстратів окиснення та пов'язана з ефективністю функціонування та селективністю їхніх транспортерів. Дисертанткою запропоновано параметри цієї оцінки: максимальна швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів за додавання різних концентрацій FCCP в присутності різних субстратів окиснення та площа приросту під кривими залежності швидкості дихання за досліджуваних концентрацій протонофора. Продемонстровано, що адаптаційна здатність мітохондрій є найвищою за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату (або їх метильованих аналогів), які окислюються FAD-залежною сукцинатдегідрогеназою та Ca^{2+} , NAD^+ -залежною α -кетоглутаратдегідрогеназою, а найнижчою – за окиснення глюкози.

Мазур Г.М. довела, що параметри визначення адаптаційної здатності гепатоцитів залежать від способу перфузії печінки перед виділенням гепатоцитів: *in vitro* (частку печінки переносили на предметне скельце та вводили перфузійну голку в кровоносні судини) або *in situ* (при розтині черевної порожнини щура перфузійний катетер вводили безпосередньо у воротну вену). За перфузії печінки *in situ* показники роз'єданого дихання гепатоцитів є вищими і мають більш виражену залежність від концентрації FCCP, адже цей спосіб перфузії дає можливість уникнення можливого впливу гіпоксії, як в умовах *in vitro*. В результаті ізольовані гепатоцити є метаболічно активними, здатними підтримувати процеси дихання на високому рівні.

Дисертантка продемонструвала, що швидкість роз'єданого дихання суттєво залежить від концентрації Ca^{2+} , а блокування mPTP циклоспорином А запобігає негативному впливу високих концентрацій катіону на швидкість дихання.

Беззаперечною позитивною рисою роботи було застосування досліджених критеріїв оцінки адаптаційної здатності мітохондрій у випадку безпосереднього впливу етанолу на гепатоцити, а також у разі короткотривалого хронічного введення алкоголю щурам. Мазур Г.М. продемонструвала, що за короткотривалого (60 хв) безпосереднього впливу етанолу на ізольовані гепатоцити максимальна швидкість роз'єданого дихання не змінюється. Але за хронічного введення етанолу *in vivo* збільшується максимальна швидкість роз'єданого дихання, тобто підвищується адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів, порівняно з введенням пірувату *in vivo*, який не впливає на досліджувані процеси. Дисертантка пояснює це можливістю активації компенсаторних механізмів, спрямованих на збереження енергетичного гомеостазу гепатоцитів, як відповідь на метаболічний стрес, що викликаний споживанням алкоголю.

На основі отриманих результатів та даних літератури Мазур Г.М. запропонувала схему взаємозв'язків між адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів та факторами, які на неї впливають.

Все відмічене робить дисертацію високою мірою наукоємною, а її висновки цілком аргументованими, які впливають із завдань і є правомірними. Хочу відмітити високу практичну цінність представленої роботи.

Результати досліджень, які викладено в дисертації Мазур Галини Михайлівни, опубліковані у відкритому друці у вигляді 12 публікацій, серед них 3 статті у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, та 9 тезах доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій і з'їздів.

Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України. Дисертацію викладено на 131 сторінці, результати досліджень ілюстровані 36 рисунками, список літератури містить 139 сучасних посилань. Автореферат відображає основний зміст дисертації. Як автореферат, так і сам текст роботи грамотно написані і ретельно вчитані.

Під час аналізу роботи виникли окремі зауваження та запитання.

Зауваження:

1. Оглядовий розділ не закінчується коротким резюме, що дозволяє дисертантці здійснити логічний перехід до експериментальної частини.

2. Велику кількість досліджуваних параметрів (широкий спектр субстратів окислення, різні концентрації протонофору, внесення циклоспорину, олігоміцину тощо) можна відмітити як позитивну рису роботи. Втім, в деяких випадках, вона заважає дисертантці провести аналіз кореляційних взаємозв'язків між досліджуваними процесами.

3. Статистичну обробку одержаних результатів проводили з використанням двофакторного аналізу ANOVA та t-критерію Стьюдента. Втім, в деяких випадках достовірність змін досліджуваних параметрів за впливу етанолу можна поставити під сумнів: рис. 3.16, А (автореферат рис. 7, А), 3.20, 3.25. Проте цей аналіз не вплинув на висновок щодо цих досліджень про відсутність впливу етанолу *in vitro* на критерії адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів.

Запитання:

1. Ви визначаєте параметри адаптаційної здатності мітохондрій за швидкістю роз'єданого дихання в присутності протонатора. В чому Ви вбачаєте сенс досліджень, запускаючи в присутності різних концентрацій Ca^{2+} окислювальне фосфорилування (додаванням ADP), потім блокуючи mPTP циклоспорином А з наступним інгібуванням АТФ-синтази олігоміцином (або навпаки), а після запускаєте процес роз'єданого дихання? Яким чином власне іони Са в досліджуваних концентраціях змінюють швидкість роз'єданого дихання? При цьому як порівняти одержані ефекти з результатами, що передували відпрацюванню критеріїв оцінки адаптаційної здатності мітохондрій, тому що як субстрати були обрані або сукцинат, або суміш субстратів – малат, глутамат та піруват.

2. Як можна пояснити зростання швидкості роз'єданого дихання за окислення пірувату в умовах передінкубації гепатоцитів з циклоспорином та етанолом, а також зростання цього показника за окислення сукцинату та передінкубації з циклоспорином порівняно з окисленням глюкози?

3. Чим пояснити більші значення (в умов. од.) мембранного потенціалу за окислення пірувату порівняно з глюкозою та м-сукцинатом? В чому Ви вбачаєте механізм зменшення потенціалу за дії ротенону при окисленні пірувату та зростання потенціалу за присутності м-сукцинату?

4. Чому етанол достовірно посилював зниження флуоресценції NADH лише за окислення м-сукцинату, але не інших субстратів?

5. Як Ви можете пояснити відсутність впливу ротенону на флуоресценцію NADH за окислення глюкози і м-сукцинату та незначне, але достовірне, зниження флуоресценції за окислення пірувату?

Наведені зауваження не знижують науково-практичну цінність проведеного дослідження. Характеризуючи роботу в цілому можна стверджувати, що вона відповідає профілю 03.00.02 - біофізика. За актуальністю досліджуваної теми, науковою новизною, теоретичною і

практичною цінністю, об'ємом експериментального матеріалу, самостійного внеску дослідника і зроблених висновків дисертація **Мазур Галини Михайлівни** "Експериментальне обґрунтування критеріїв адаптаційної здатності мітохондрій гепатоцитів щурів" є окремим завершеним дослідженням і відповідає вимогам до кандидатських дисертацій п.п. 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24.07.2013 зі змінами, внесеними згідно з постановою Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, а її авторка **Мазур Галина Михайлівна** заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

Кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України



Г.В. Данилович

