

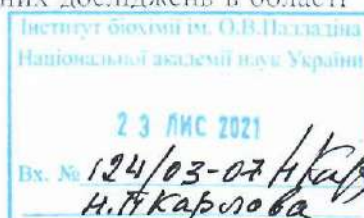
ВІДЗИВ офіційного опонента

на дисертацію Данилович Ганни Вікторівни «Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза», представлену на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія

На даний час незаперечно доведено ключову регуляторну роль оксиду азоту (NO) в біохімії клітини. NO є універсальним регулятором фізіологічно значимих систем організму і життєво важливих клітинних функцій, зокрема метаболізму та мембранно-транспортних процесів: каналів, обмінників та іон-транспортувальних ферментів. Регуляторні функції NO здійснюються як за посередництвом NO-залежних сигнальних шляхів, так і через безпосередню взаємодію NO з клітинними тілами, ліпідами, а також АФК. Відомо, що NO ендогенно утворюється в організмі декількома шляхами, основними з яких є ферментативний синтез NO-синтазами, вивільнення з внутрішньоклітинних нітрозотіолів, які виконують функцію «депо» NO, та утворення NO відновним шляхом, переважно нітрит- та нітрат-редуктазами.

Однією з основних молекулярних мішеней NO є Ca^{2+} -транспортувальні системи як плазматичної мембрани, так і внутрішньоклітинних компартментів. У м'язових тканинах виключно важлива роль NO полягає в регуляції їх скоротливої активності, яка здійснюється в першу чергу через взаємодію NO з Ca^{2+} -транспортувальною системою м'язових клітин: Ca^{2+} каналами сарколеми та саркоплазматичного ретикулу, Ca^{2+} АТРазами, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінником плазматичної мембрани та Ca^{2+} транспортувальною системою мітохондрій, яка у мітохондріях міомерія включає Ca^{2+} уніпортер (MCU) та $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінник.

Актуальність теми дисертації. На разі відомо, що системи NO та системи транспортування Ca^{2+} реципрокно регулюються численними механізмами прямого та зворотного зв'язку, які за нормальних фізіологічних умов слугують для оптимальної регуляції Ca^{2+} гомеостазу клітин, продукції АФА і АФК. Відомо, що на клітинному рівні збільшення концентрації Ca^{2+} в цитозолі активує біосинтез NO Ca^{2+} -залежними ізоформами NO-синтаз, що в свою чергу призводить до активації або інгібування Ca^{2+} транспортувальних систем і здійснює зворотний вплив на внутрішньоклітинний рівень Ca^{2+} . Подібні механізми наявні і в мітохондріях, де експресується мітохондріальна ізоформа NOS (mtNOS), проте їх вивчення ще тільки починається. Отже дослідження біосинтезу NO в мітохондріях та з'ясування його регуляторної ролі щодо енергетичного стану, функціонального стану та Ca^{2+} гомеостазу мітохондрій є актуальним і нагальним завданням сучасних досліджень в області біохімії.



Особливістю NO-залежних механізмів, як і Ca^{2+} -залежних, є їх внутрішньоклітинна компартменталізація, завдяки чому багаторазово підвищується ефективність NO-залежної регуляції клітинних функцій та їх спряження з Ca^{2+} -залежними процесами на локальному рівні. Тому визначення клітинної локалізації NOS-залежного біосинтезу NO та NOS-незалежних механізмів утворення NO є важливим напрямком в галузі досліджень оксиду азоту, оскільки підносить розуміння молекулярних механізмів NO-залежних процесів регуляції клітинних функцій на новий більш прогресивний рівень. Якщо відпочатку NO-синтази, з яких на разі відомі три ізоформи (ендотеліальна, індукцйбельна та нейрональна) вважались виключно цитозольними ферментами, то натеper вже добре відомо, що в мітохондріях експресується мітохондріальна ізоформа NOS, mtNOS, за молекулярною будовою близька до нейрональної, яка відіграє важливу роль в регуляції мітохондріальних функцій на локальному мітохондріальному рівні.

Новизна дисертаційної роботи. Порівняно нещодавне відкриття mtNOS спричинило стрімке зростання інтересу науковців до вивчення механізмів регуляції біосинтезу NO в мітохондріях, визначення його ролі в регуляції біохімічних процесів в мітохондріях і фізіологічних процесів в організмі загалом. В першу чергу увага дослідників була сфокусована на вивченні ролі мітохондріального NO в регуляції функціонування дихального ланцюга і транспорту Ca^{2+} . Встановлено, що безпосередніми мішенями NO в мітохондріях є комплекси I і IV дихального ланцюга, пригнічення яких відіграє важливу цитопротекторну роль за ішемічних та гіпоксичних станів м'язових тканин. Відомо, що NO, синтезований в мітохондріях, також включається в регуляцію функціонального стану органел, їх метаболізму і Ca^{2+} гомеостазу, зокрема, через модуляцію комплексів дихального ланцюга та активності циклоспорин-чутливої пори, які є одними з безпосередніх мішеней NO. В свою чергу, в мітохондріях міокарда було доведено активацію біосинтезу NO, за механізмом зворотного зв'язку, через потенціалзалежний вхід Ca^{2+} .

Проте попри збільшення числа наукових праць за даною тематикою, роботи, присвячені вивченню системи NO в мітохондріях на даний час ще є надто нечисленними. Як молекулярні механізми NO-залежних процесів в мітохондріях, так і фізіологічне значення біосинтезу NO в цих органелах, а також їх регуляція з боку Ca^{2+} транспортувальної системи мітохондрій, залишаються далеко не з'ясованими, а щодо міометрія, такі процеси практично не розглядались зовсім. Отже, на часі є вивчення біохімічних механізмів реципрокної регуляції систем біосинтезу NO і транспортування Ca^{2+} в цих внутрішньоклітинних структурах і виявлення їх клітинно-специфічних особливостей.

В роботі Ганни Вікторівни Данилович вперше проведено ідентифікацію, візуалізацію і комплексне дослідження біосинтезу NO в мітохондріях гладенького м'яза, визначення

біохімічних характеристик ензиматичного утворення NO mtNOS; вивчення регуляторної ролі NO щодо дихального ланцюга, Ca^{2+} -транспортувальних систем і Ca^{2+} -гомеостазу мітохондрій, а також з'ясування ролі мітохондріального потенціалзалежного транспорту Ca^{2+} в регуляції біосинтезу NO (власне, активності mtNOS) в цих органелах. На даний час в світовій науковій літературі відсутні аналогічні дослідження функціонування системи NO в мітохондріях міометрія, що визначає новизну і пріоритет дисертаційної роботи Г.В. Данилович в даній галузі.

Одним із перспективних напрямків сучасних біомедичних досліджень є вивчення можливостей застосування макроциклічних сполук, каліксаренів, як нетоксичних модуляторів багатьох клітинних функцій, мембранно-транспортних процесів, активності каналів, обмінників і ферментів. Зокрема, внаслідок багаторічних досліджень відділу біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАНУ за участю дисертантки, встановлено високу спорідненість ряду каліксаренів до Ca^{2+} транспортувальних систем плазматичної мембрани і мітохондрій, що відкриває перспективи спрямованої регуляції Ca^{2+} гомеостазу та скоротливої активності міоцитів. Цілком новим завданням в даній царині досліджень, поставленим та виконаним дисертанткою, було вивчення впливу каліксаренів на біосинтез NO в мітохондріях міометрія. Результати, одержані Г.В. Данилович, мають пріоритетний характер і вказують на можливість застосування каліксаренів для регуляції активності mtNOS та акумуляції Ca^{2+} в даних органелах, а в подальшій перспективі – на можливість застосування цих сполук з метою фармакологічної регуляції скоротливої активності міометрія.

Робота побудована за традиційною схемою і включає вступну частину, огляд літератури, методичну частину, результати дослідження і висновки.

У вступній частині обґрунтована актуальність дослідження, сформульовано мету і завдання, окреслена новизна роботи та її практичне значення.

В огляді літератури подано ґрунтовний аналіз наявних літературних даних щодо біохімічних властивостей NOS-залежного біосинтезу NO, структури, локалізації та ензиматичних властивостей NOS, детально розглянуті клітинні системи транспортування Ca^{2+} . Окремий розділ присвячено аналізу літературних даних щодо біологічної активності каліксаренів. Автор демонструє глибоку обізнаність із сучасним станом досліджень біохімії NO, Ca^{2+} транспортувальних систем плазматичної мембрани та мітохондрій, мітохондріальної біоенергетики.

В методичній частині докладно описані методи дослідження та умови проведення експериментів. Методичні підходи, використані автором, докладно обґрунтовано. Автор

застосовує ряд власних інноваційних методичних розробок, які розширюють методологічний інструментарій сучасної біохімії і мембранології.

Викладення експериментальної частини дисертації послідовно і логічно розкриває ключову концепцію роботи. Експериментальна частина узагальнюється математичною моделлю, побудованою за методом мереж Петрі, в якій встановлено взаємозв'язок між входом Ca^{2+} , біосинтезом NO, регуляцією утворення АФК і активності циклоспорин-чутливої пори.

Основна концепція роботи полягає в тому, що мітохондрії, зокрема гладеньком'язових клітин, є одночасно джерелом і мішенню NO. NO, який синтезується mtNOS, локалізованою в мітохондріях міомерія і регулюється входом Ca^{2+} в межах концентрацій співвідносних з K_m MCU, в свою чергу регулює енергетичний стан, утворення АФК і роботу дихального ланцюга, а отже здійснює суттєвий вплив на функції мітохондрій.

NO-залежна активація MCU в мітохондріях міомерія є одним з механізмів дії NO, спрямованих на зниження рівня цитозольного Ca^{2+} в міоцитах. Певні представники ряду каліксаренів здатні селективно активувати mtNOS і регулювати акумуляцію Ca^{2+} в мітохондріях, що дає підстави для використання даних сполук з метою регуляції функцій та енергетики мітохондрій. На підставі скринінгу ряду сполук, в роботі Г.В. Данилович зроблено висновок про перспективність використання каліксарену С-956 як модулятора входу Ca^{2+} і активатора mtNOS.

Результати роботи викладені в чіткій і логічній послідовності. Роботу завершує заключний узагальнюючий розділ, в якому окреслено основні результати власних досліджень автора, і ключові положення дисертації.

Обґрунтованість наукових положень і висновків дисертації. Для досягнення поставлених завдань автор використовує широкий арсенал сучасних біохімічних і фізико-хімічних методів дослідження, якими володіє на високому професійному рівні. Робота виконана із залученням флуоресцентної і абсорбційної спектроскопії, цитофлуориметрії, лазерної конфокальної мікроскопії, біохімічної кінетики, ензимології, методу динамічного світлорозсіювання і ряду препаративних методів.

Переважна більшість експериментальних результатів одержана вперше і встановлена шляхом поєднання різних методичних підходів. Експериментальні дані, на яких ґрунтуються основні положення і висновки роботи, добре узгоджуються між собою. Бездоганно виглядає серія експериментів, присвячена візуалізації біосинтезу NO, виконана із залученням сучасних прогресивних методів цитофлуориметрії і конфокальної мікроскопії із застосуванням відповідних флуоресцентних зондів. Достовірність результатів і

обґрунтованість висновків забезпечується використанням загальноприйнятих методів статистичного аналізу.

Теоретичне і практичне значення результатів роботи. В сучасній літературі тільки починають формуватися уявлення про регуляторні функції NO, ендогенно синтезованого в мітохондріях. Робота Г.В. Данилович значно поглиблює уявлення про біохімічні механізми, за посередництвом яких mtNOS-залежна продукція NO може контролювати функціональний стан і Ca^{2+} -гомеостаз мітохондрій, а також долучатися до контролювання скоротливої активності гладеньком'язових тканин. Тому робота Г.В. Данилович має фундаментальне теоретичне значення, оскільки поглиблює розуміння регуляторних функцій NO щодо мембранно-транспортних процесів в мітохондріях за умов нормальної фізіології. Важливим теоретичним здобутком дисертантки є розроблення та експериментальне підтвердження математичної моделі NO-залежних біоенергетичних процесів в мітохондріях міометрія за методом мереж Петрі. Теоретичні набутки дисертації можуть бути включені до викладання відповідних спецкурсів у вузах біомедичного профілю.

В практичному аспекті цінність наукового доробку дисертантки полягає у виявленні і дослідженні специфічної дії каліксарену C-956 на систему біосинтезу NO і Ca^{2+} -транспортувальну систему мітохондрій міометрія. Одержані результати потенціально можуть бути важливими для подальшої розробки ефективних селективних засобів фармакологічної корекції розладів функціонування міометрія і запобігання розвитку захворювань, пов'язаних з мітохондріальною дисфункцією.

Робота Г.В. Данилович являє собою фундаментальну наукову працю, в якій поставлені питання досить всебічно і ґрунтовно розглянуті з використанням сучасних наукових методів. Значною перевагою даної роботи є комплексний характер дослідження, яке на мітохондріях міометрія проведено вперше.

Результати досліджень опубліковані у відкритому друці у вигляді 51 наукових робіт, з яких 1 монографія, 26 статей у фахових вітчизняних та закордонних виданнях, 21 з яких включено до міжнародної наукометричної бази Scopus, а також 24 тези доповідей у матеріалах міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій. Структура і написання дисертації відповідають вимогам ДАК МОН України.

Дисертацію викладено на 253 сторінках, результати досліджень ілюстровані 100 рисунками, 2 схемами, 5 таблицями. Список літературних джерел містить 492 посилань. Опубліковані наукові праці здобувача повністю відображають основні наукові результати дисертації. Автореферат відображає основний зміст дисертації.

Проте попри методологічну обґрунтованість, достовірність і значимість наукових результатів, одержаних у роботі, при ознайомленні з дисертацією виникає ряд наступних запитань та зауважень:

1. Робота присвячена вивченню біосинтезу та регуляторній ролі NO в мітохондріях. Однак, NO в мітохондріях утворюється також внаслідок відновлення нітриту та нітрату відповідними редуктазами. Отже, автор мав би уточнити, чому під «біосинтезом NO» мається на увазі власне активність mtNOS. Чи спостерігали в роботі NOS-незалежне утворення NO з зондом DAF?
2. Використання Ca^{2+} в концентраціях, співставних з K_m для MCU становить методичну проблему за використання надто малих кількостей білка, оскільки відбувається значна Ca^{2+} перегрузка мітохондрій, яка може призводити до деполаризації мембрани, інгібуванню $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ обмінника і блокування MPTP.
3. Визначення K_a mtNOS за Ca^{2+} з зондом DAF також становить методичну проблему, оскільки концентрація Ca^{2+} в матриці не відповідає концентрації Ca^{2+} в середовищі інкубації.
4. Авторська схема дії каліксаренів на Ca^{2+} гомеостаз та біосинтез NO mtNOS включає інгібування $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ обмінника каліксареном С-956, збільшення концентрації Ca^{2+} в матриці, і відповідно, стимуляцію mtNOS. Проте власні дані автора не показують підвищення концентрації Ca^{2+} за дії С-956.

Зазначенні зауваження не зменшують наукової і практичної цінності дисертаційної роботи Г.В. Данилович, яка є фундаментальним завершеним науковим дослідженням, що відповідає профілю 03.00.04 – біохімія. За актуальністю, новизною, обґрунтованістю основних положень і висновків, науковою і практичною значимістю дисертація Данилович Ганни Вікторівни «Біосинтез та регуляторна роль оксиду азоту в мітохондріях гладенького м'яза» повною мірою відповідає вимогам ДАК МОН України щодо докторських дисертацій, а її авторка Данилович Ганна Вікторівна заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія.

Доктор біологічних наук
 провідний науковий співробітник
 відділу фізіології кровообігу
 Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця
 НАН України



ІНСТИТУТ ФІЗИОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
 НАН УКРАЇНИ
 І. А. А. А.
 І. А. А. А.
 І. А. А. А.

О.В. Аكوпова