

ОТЗЫВ

официального оппонента – доктора биологических наук
Белослудцева Константина Николаевича на диссертационную работу
Харечкиной Екатерины Сергеевны на тему: «Регуляция неспецифической Ca^{2+} -зависимой
митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми
нуклеотидами со стороны цитозоля», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Актуальность темы исследования.

Изучение механизмов клеточной гибели при действии внешних и внутренних факторов является одним из самых популярных и актуальных направлений современной биомедицины. Несмотря на то, что исследования в данной области ведутся во многих лабораториях мира, мы еще до сих пор далеки от точного понимания этих процессов.

Общепризнанно, что одним из механизмов индукции клеточной гибели является увеличение неспецифической проницаемости внутренней митохондриальной мембраны – открывание митохондриальной Ca^{2+} -зависимой поры (МРТ поры). Избыточное поступление Ca^{2+} в митохондриальный матрикс и развитие окислительного стресса обеспечивают формирование МРТ поры, что будет приводить к коллапсу мембранного потенциала, нарушению биоэнергетических функций митохондрий и ионного митохондриального гомеостаза, набуханию органелл и их деструкции. Следствием этого станут процессы клеточной дегенерации и клеточной гибели. Несмотря на более чем 60-летнюю историю исследований МРТ поры, до сих пор не установлена ее точная структура. На сегодняшний день принято говорить о том, что МРТ пора является белковым мегаканалом внешней и внутренней мембраны. При этом единственным белком, который точно участвует в формировании МРТ поры, является ее регулятор циклофилин Д – мишень специфического ингибитора поры – циклоспорина А. Основные дебаты ведутся по поводу белков, формирующих канал поры во внутренней митохондриальной мембране. В этом качестве рассматривают несколько белков: аденилаттранслокатор (ANT), АТФ-синтазу и фосфатный переносчик. К сожалению, даже наличие современных молекулярно-генетических подходов пока не помогает точно определить этот компонент. Вместе с тем нельзя отрицать, что поиск новых и расшифровка имеющихся регуляторных процессов также будет способствовать пониманию механизмов формирования митохондриальной поры и связанной с ней митохондриальной дисфункции. Работа Харечкиной Е.С. как раз посвящена решению подобных проблем. В своей диссертации Екатерина Сергеевна продемонстрировала, что образование МРТ поры может модулироваться не только пиридиновыми нуклеотидами (NADH), которые содержатся внутри митохондрий, но и внешним пулом. Диссертант

попытался отыскать мишень для такого механизма регуляции. Также в работе был установлен участие NAD(P)H в генерации всплеск супероксидного аниона при пермеабиллизации митохондрий и описаны условия возникновения этих всплесков.

Общая характеристика, структура и оформление диссертации.

Диссертация Харечкиной Е.С. включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 123 страницах, содержит 27 рисунков и 1 таблицу. В списке процитированной литературы 321 источник.

Во «Введении» автор обосновывает актуальность изучаемой темы, формирует цель и задачи работы, характеризует научную новизну, научно-практическую значимость результатов исследования, определяет научные положения, выносимые на защиту, приводит данные о личном вкладе автора, публикациях в журналах и апробации работы на конференциях.

В разделе «Обзор литературы» Екатерина Сергеевна представила свой взгляд на изучаемую проблему. В обзоре литературы рассмотрены 2 основных темы: неспецифическая Ca^{2+} зависимая митохондриальная пора, ее строение, модуляторы и механизмы образования активных форм кислорода при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

В разделе «Материалы и методы исследования» автор приводит описание всех методик, используемых в работе. В работе используется широкий спектр методов биохимии, биофизики и клеточной биологии, которые позволяют охарактеризовать полученные результаты. Исходя из использованных методов и полученных результатов можно сказать, что диссертационная работа Харечкиной Е.С является добротной работой в области современной митохондриологии.

В работе автор ставит перед собой две основных задачи: 1) определить какие пиридиновые нуклеотиды способны ингибировать образование МРТ поры снаружи митохондрий и попытаться установить их возможную мишень; 2) оценить вклад пиридиновых нуклеотидов в генерацию всплеск супероксид-аниона при пермеабиллизации митохондрий и определить условия для этого процесса. В соответствии с этим результаты исследования изложены в 2 главах. Первая глава посвящена изучению влияния пиридиновых нуклеотидов на индукцию МРТ поры в митохондриях печени крыс. Здесь стоит упомянуть, что эффект эндогенных внутримитохондриальных пиридиновых нуклеотидов на открывание МРТ поры в митохондриях был изучен достаточно давно. Всегда считалось, что пиридиновые нуклеотиды действуют с матриксной стороны внутренней митохондриальной мембраны и для ингибирующего действия прежде всего

важно отношение восстановленного и окисленного пула пиридиновых нуклеотидов. Новизна настоящей работы связана с тем, что автор впервые показал, что модулировать открывание MPT поры в митохондриях печени крыс можно с помощью внешнего пула пиридиновых нуклеотидов. Показано, что NADH и NAD (но не NAD(P)H) ингибируют открывание MPT поры. Продемонстрировано, что эффект NAD и NADH не связан с работой какой-либо NAD(H)-зависимой оксидоредуктазы. Предположено, что данные нуклеотиды ингибируют открывание MPT поры путем связывания с внешним аллостерическим регуляторным сайтом. Изучено, как ингибиторное действие NADH сочетается с другими модуляторами MPT поры, такими как магний, циклоспорин А и адениновые нуклеотиды. Поиск возможной мишени действия NADH позволил автору заключить, что этой мишенью не являются VDAC внешней митохондриальной мембраны и SCaMC внутренней митохондриальной мембраны. Автор предположил, что защитное действие NADH может модулироваться ANT. Этот результат в пользу гипотезы, что именно ANT является каналом MPT поры.

Вторая часть результатов исследования посвящена изучению генерации всплеск супероксид-аниона в пермеабелизованных митохондриях. Харечкина Е.С. продемонстрировала, что увеличение неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий вследствие открывания MPT поры или при добавлении к органеллам порообразующих пептидов аламетицина или фузарицидина приводит к генерации супероксид-аниона. Данный процесс регулируется добавленными пиридиновыми нуклеотидами (NAD(P)H, в меньшей степени NADH) и связан с работой матричных NAD(P)H оксидоредуктаз. В зависимости от концентрации пиридиновых нуклеотидов изменяется и время начала генерации всплеска супероксид-аниона в митохондриях. Но стоит отметить, что всплеск всегда начинается после существенного окисления NAD(P)H матрикса. Важным результатом является и то, что автор предложил алгоритм генерации всплеск супероксид-аниона в митохондриях печени крыс с участием добавленного NAD(P)H.

Таким образом, в своей работе Харечкина Е.С. описывает новые механизмы регуляции функционирования митохондрий пиридиновыми нуклеотидами.

Раздел «Заключение» обобщает полученные в работе результаты. Выводы оригинальны и полностью соответствуют полученным результатам.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения.

Степень достоверности полученных Харечкиной Е.С. результатов подтверждается множественностью и воспроизводимостью полученных данных. В работе использовались современные методы исследования в области биохимии, биофизики и клеточной

биологии. Также о достоверности полученных данных свидетельствует то, что они были опубликованы в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах. Таким образом, достоверность результатов, положений и заключения не вызывает сомнений.

Научная новизна, теоретическая и практическая ценность исследования.

Полученные при выполнении диссертационной работы Харечкиной Е.С. данные имеют большую научную значимость в данной области исследований. Они развивают представления о регуляции митохондриальной поры и генерации активных форм кислорода в клетке при патологических процессах. В настоящей работе впервые показано, что экзогенные пиридиновые нуклеотиды (NADH) способны подавлять образование MPT поры. Предложена возможная митохондриальная мишень данного действия NADH. Полученные результаты в будущем, несомненно, будут способствовать идентификации структуры MPT поры. Впервые показано участие внешнего и внутреннего пула NAD(P)H в генерации всплеск супероксидного аниона при пермеабилзации митохондрий. Продемонстрированы условия для возникновения этих всплесков. Все это в полной мере обеспечит прогресс в понимании механизмов патологии клеток при развитии окислительного стресса.

Пожелания, вопросы и замечания.

Давая положительную оценку полученным результатам и сделанным выводам, хотел бы остановиться на некоторых моментах, которые вызывают вопросы и замечания.

1. Автор не очень хорошо проработал современную литературу. Практически отсутствует цитирование литературы последних двух лет. Здесь важно сказать, что в последние пару лет в литературе появились новые данные об участии или неучастии в формировании поры таких белков как с субъединица АТФ-синтазы, аденилаттранслокатор, SPG7 и других. Также было продемонстрировано число пор на 1 митохондрию и сделан вывод о том, что формирование поры скорее случай, который происходит лишь в небольшой популяции предполагаемых поровых белков. Возможно поэтому и тяжело определить точную структуру MPT поры. Также хотелось бы при обсуждении моделей митохондриальной поры увидеть упоминание о других механизмах пермеабилзации митохондрий. Так абсолютно не упоминается такой механизм пермеабилзации органелл как открытие липидной циклоспорин А-нечувствительной поры, индуцированной Ca^{2+} и насыщенными жирными кислотами, идея о которой развивалась в ИТЭБ РАН в лаборатории проф. Г.Д. Мироновой. Все это значительно улучшило бы обзор литературы.

2. Автор не очень детально описал как они измеряли параметры максимальной амплитуды набухания и время полумаксимального набухания. Что они принимали за максимальное значение амплитуды – набухание от аламетицина или набухание от открытия МРТ поры при добавлении Ca^{2+} ? В каждом случае амплитуда будет различаться. Какое время было отведено для оценки максимальной амплитуды набухания? Все это не указано. Хотелось бы, чтобы автор прояснил этот вопрос. Иначе не очень понятно, насколько корректно представлены данные на рис. 4, 5, 7 и 8, где параметр амплитуда набухания выражена в процентах.

3. Автор говорит о том, что способность NADH и Mg^{2+} синергично подавлять РТР может указывать либо на взаимодействие комплекса Mg-NAD(H) с внешним регулятором РТР или на их синергичный эффект, оказываемый на различные сайты. При этом автор совершенно не учитывает то, что магний, с одной стороны, является ингибитором Ca^{2+} унипортера и таким образом, предотвращает поглощение входа Ca^{2+} в митохондрии. С другой стороны известно, что магний в высоких концентрациях экранирует поверхностный потенциал мембраны митохондрий, что также будет подавлять многие митохондриальные транспортные процессы, в том числе и образование МРТ поры. Хотелось бы, чтобы автор прокомментировал как данные механизмы могут соотноситься с синергичным эффектом NADH.

4. Хотелось бы услышать комментарии автора, почему NAD(P)H гораздо эффективнее при генерации всплеск супероксид аниона, чем NADH.

5. Во второй части работы, посвященной влиянию пиридиновых нуклеотидов на генерацию всплеск супероксид аниона большинство данных представлены в виде динамических кривых изменений уровня хемилюминесценции MCLA. Хотелось бы пожелать автору, чтобы в будущем он представлял нормированные по изучаемому параметру результаты (в данном случае по супероксид аниону). Это будет более доступно для понимания и анализа данных.

Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа Е.С. Харечкиной в целом заслуживает высокой положительной оценки. Критические комментарии вызваны интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям.

Таким образом, следует признать, что диссертационная работа Е.С. Харечкиной, вне всякого сомнения, выполнена на актуальную тему на современном методическом уровне, содержит новые серьезные научные результаты, имеющие важное значение для развития современной биохимии, клеточной биологии и биомедицины. Содержание автореферата и опубликованных статей полностью отражает содержание диссертации. Считаю, что диссертационная работа Екатерины Сергеевны Харечкиной на тему

«Регуляция неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля» полностью соответствует требованиям, изложенным в п.9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент

Профессор кафедры биохимии,
клеточной биологии и микробиологии
ФГБОУ ВО «Марийский
государственный университет»


доктор биологических наук, доцент
Белослудцев
Константин Николаевич



Адрес: 424000, Марий Эл, г. Йошкар-Ола, пл. Ленина, д. 1, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Марийский государственный университет»
Телефон: (8362)68-80-02
Сайт: www.marsu.ru
e-mail: bekonik@gmail.com