

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Дерябиной Юлии Ивановны, на диссертационную работу Екатерины Сергеевны Харечкиной «Регуляция неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля», предоставленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия».

Актуальность избранной темы

Тема диссертационной работы Харечкиной Е.С. соответствует одной из значимых проблем современной фундаментальной медицины – регуляции неспецифических мембранных изменений митохондрий, имеющих место при ряде патологий, включая ишемические нарушения миокарда, нейродегенеративные расстройства и онкологические заболевания. Предполагается, что открывание поры является ключевым фактором, индуцирующим гибель клеток и необратимые изменения на уровне органов и всего организма. Однако, несмотря на интенсивные исследования, проводимые в этом направлении, эффективных препаратов для коррекции этого патологического состояния, до сих пор не найдено, что обуславливает высокую актуальность поиска потенциальных модуляторов неспецифической мембранной проницаемости митохондрий, проведенной в представленной диссертационной работе.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Научные положения и выводы, сформулированные в работе, обоснованы и подтверждены экспериментальным материалом.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В работе впервые детально исследованы эффекты экзогенных пиридиновых нуклеотидов на индукцию неспецифической поры с внешней стороны внутренней митохондриальной мембраны, и генерацию супероксидного анион-радикала при ее развитии. Впервые продемонстрировано, что пиридиннуклеотиды в различной степени эффективности, но в дозозависимой манере подавляют развитие феномена поры в терминально дифференцированных клетках за счет взаимодействия с аллостерическим нуклеотид-связывающим сайтом, локализованным во внешней митохондриальной мембране или внешней стороне внутренней мембраны митохондрий. Также впервые показан вклад транслокатора адениновых нуклеотидов в защитном действии НАД(Н) и

участие НАД(Ф)Н матрикса и цитозоля в генерации супероксидного радикала при пермеабиллизации митохондриальных мембран. Научно-практическая значимость работы не вызывает сомнения. Полученные в работе результаты дают представление о не известных ранее механизмах участия пиридиновых нуклеотидов в регуляции жизнеспособности клеток при физиологических и патологических состояниях и могут лечь в основу дальнейшей идентификации нуклеотид-связывающего регулятора неспецифической мембранной поры в митохондриях. Идентифицируемый белок может рассматриваться в качестве перспективной мишени фармакологической коррекции патологий, в основе которых лежит запуск клеточной гибели в результате открывания поры (например, ишемия/реперфузия) или ее ингибирование (злокачественные образования). Следует также подчеркнуть, что анализ соединений с митопротекторными свойствами из линейки природных метаболитов клетки, проведенный в представленной работе диссертанта, придает ей высокую практическую значимость и может явиться хорошим инновационным заделом будущих исследований.

Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенность

Диссертация изложена на 123 страницах текста. Литературный обзор включает анализ большого числа как отечественных, так и зарубежных источников. Кроме обзора литературы в диссертации представлены введение, описание объекта и методов исследования, главы с полученными результатами и их обсуждением (2 главы), заключение, и список литературы (321 источник). Иллюстративный материал включает 1 таблицу и 27 рисунков.

Литературный обзор, представленный автором, информативен, в нем рассматриваются основные характеристики неспецифической поры, ее активаторы и ингибиторы, а также физиологическая и патофизиологическая роли. В отдельной главе представлен материал о механизмах образования активных форм кислорода (АФК) при пермеабиллизации митохондриальных мембран. В настоящем обзоре приводятся данные, подтверждающие участие поры в развитии патологических состояний и выполнении клеточных функций, при этом особое внимание уделено вопросу ее регуляции. Обсуждаются современные модели комплекса поры. Также рассматриваются современные представления о механизмах, лежащих в основе генерации АФК при увеличении проницаемости мембран митохондрий. Обсуждается роль ионов Ca^{2+} , дыхательной комплексов, пиридиновых нуклеотидов и компонентов антиоксидантной системы в продукции АФК.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание используемых в исследовании методов. В работе применяли адекватные для решения поставленных задач

современные методы физико-химической биологии, что позволило эффективно провести исследования заявленного уровня. Все полученные экспериментальные данные подвернуты статистической обработке.

Проведенные автором исследования логичны, последовательны и изложены в двух главах экспериментальной части. В первой главе описывается влияние добавленных пиридиннуклеотидов на индукцию неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры. Автор показывает, что пиридиновые нуклеотиды НАДН и НАД, действуя со стороны цитозоля, оказывают ингибирующее действие на индукцию Ca^{2+} -зависимой неспецифической поры в изолированных митохондриях с эффектом, сопоставимым с действием адениновых нуклеотидов. В разделе также проведено определение механизма регуляции неспецифической Ca^{2+} -зависимой поры посредством НАД(Н) и показано, что механизм подавления поры экзогенным НАД(Н) не связан с накоплением адениновых нуклеотидов в матриксе и функционированием короткого Ca^{2+} -связывающего митохондриального переносчика. Таким образом, в первой главе экспериментальной части впервые были описали эффекты, оказываемые внемитохондриальными пиридиннуклеотидами на регуляцию открывания неспецифической поры митохондрий. На изолированных органеллах, выделенных из печени крыс, а также на гепатоцитах и кардиомиоцитах было показано, что НАДН и, в меньшей степени, НАД в микромолярных и миллимолярных концентрациях оказывают дозозависимое ингибирующее действие на проницаемость. Высказано предположение, что регуляторный сайт действия этих соединений является аллостерическим, поскольку при проявлении своего защитного эффекта НАД(Н) не окисляется и не восстанавливается. Полученные результаты позволили автору предположить, что НАД(Н) может оказывать эффекты на пору через транслокатор адениновых нуклеотидов.

Вторая глава экспериментальной части посвящена исследованию регуляции генерации супероксидного аниона, индуцированной пермеабиллизацией митохондриальных мембран, экзогенным НАД(Ф)Н. Автор показал, что при физиологических концентрациях цитозольных НАД(Ф) и НАД(Ф)Н генерация супероксида в пермеабиллизированных митохондриях происходит, если редокс-потенциал НАД(Ф)Н сдвигается в сторону положительных значений. Полученные результаты объясняют механизм формирования генерации АФК, которые сопровождают развитие поры в митохондриях при патологических ситуациях, в частности, при ишемических состояниях. В заключении к главе автором приведена гипотетическая схема, описывающая механизм генерации АФК при пермеабиллизации митохондриальных мембран.

Представленный иллюстративный материал наглядно отражает результаты экспериментов. Интерпретация полученных диссертантом результатов интересна и подкреплена большим экспериментальным материалом, что позволяет считать представленную работу законченным и экспериментально подтвержденным трудом. Выводы, сделанные автором, теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены. Основные положения диссертационной работы представлены в 4 публикациях в рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ и главе в монографии.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Изложенные в автореферате материалы в целом кратко отражают полученные в работе результаты исследований и соответствуют основным положениям диссертационной работы.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Опубликованные работы содержат основные материалы, изложенные в диссертации.

Замечания к диссертационной работе

В то же время работа не лишена и некоторых недостатков, в связи с чем, возникли следующие вопросы и замечания:

- 1) В литературном обзоре в главе 1.2. (Модели РТР) при рассмотрении структуры поры и возможных кандидатов, участвующих в ее развитии, описано участие АТФ-азы без ссылки на свежие работы, опровергающие его участие (Neginskaya, M.A.; Solesio, M.E.; Berezhnaya, E.V.; Amodeo, G.F.; Mnatsakanyan, N.; Jonas, E.A.; Pavlov E.V. ATP synthase c-subunit-deficient mitochondria have a small cyclosporine A-sensitive channel, but lack the permeability transition pore. Cell Rep., 2019, 26, 11-17. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.033; Walker, J.E.; Carroll, J.; He, J. Reply to Bernardi: The mitochondrial permeability transition pore and the ATP synthase. Proc Natl Acad Sci USA. 2020, 117, 2745-2746. doi: 10.1073/pnas.1921409117). При анализе литературных источников основной акцент делается на рассмотрение патологических состояний сердца, вызванных ишемией/реперфузией, однако, учитывая, что значительная часть работы выполнена на митохондриях печени крыс, хотелось бы увидеть в данном разделе больше информации о феномене неспецифической поры при патологиях печени. Вызывают сожаление используемые автором неудачные выражения, являющиеся подчас буквальным переводом: ««вспышки» супероксид аниона», «формы внешних пиридиновых нуклеотидов», «исследования, проведенные на нокаутных мышах», «редкая проводимость канала», «респираторный блок», «лейциновый замок-EF-руку (Letm1) mCa1&2» и опечатки в тексте.
- 2) В разделе «Материалы и методы» (п.4.2) при описании методики измерения уровня супероксидного радикала не указаны параметры (длины волн возбуждения и эмиссии), при

которых проводили исследование. В п 4.3. написано, что «Активность аконитазы выражали в нмоль·мин⁻¹·мг белка⁻¹», однако, продукт реакции не указан.

3) В разделе 1.1.1. (Способы определения индукции РТР в изолированных митохондриях) представлена репрезентативная картина высокоамплитудного набухания митохондрий печени крыс при окислении системы глутамат+малат, хотя общеизвестно, что для этого типа митохондрий наиболее активно метаболизируемым субстратом является сукцинат. Выбор субстрата в данном исследовании требует пояснений, тем более, что последующие эксперименты были проведены с использованием сукцината в качестве субстрата окисления. Вызывает вопросы использование в одной серии экспериментов различных концентраций Ca^{2+} (например, в экспериментах, представленных на рис. 4, использовали 30 мкМ катион, а на рис. 5 – 20 мкМ). Кроме того, в исследованиях используются различные концентрации митохондриального белка – от 0,5 до 1,5 мг в мл, что также требует пояснений. В разделе 1.2.4. (Эффект НАДН на Ca^{2+} -емкость митохондрий пермеабилizованных клеток) приведен перечень белков, потенциально способных связывать НАД(Ф)Н, однако, не указаны их названия или семейства, что не позволяет определить правомочность дальнейшего выбора митохондриального порина VDAC в качестве потенциального белка-мишени.

4) На Рис. 18. представлены результаты эффекта осмотического набухания интактных митохондрий на хемилюминесценцию зонда MCLA во времени (панель Б). Но кажется очевидной избыточность временной инкубации в течение 160 минут, учитывая, что максимальные эффекты достигаются через 60 минут, а в ряде случаев, и ранее.

5) В работе отсутствует отдельный раздел с выводами, которые приведены в конце заключения.

6) В качестве общего замечания следует отметить высокую перегруженность рисунков экспериментальным материалом, содержащим массу сокращений. Некоторые из терминов, фигурирующих в тексте, не расшифрованы (BAPTA-AM, названия радикалов ONOO-, NO•, DMEM, FBS, DLD), ряд сокращений выполнен то на русском, то на английском языке, что затрудняет восприятие материала.

Заключение

Диссертационная работа Екатерины Сергеевны Харечкиной «Регуляция неспецифической Ca^{2+} -зависимой митохондриальной поры (РТР) и генерации супероксид-аниона пиридиновыми нуклеотидами со стороны цитозоля», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия» является завершенной научно-квалификационной работой и полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным

Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а её автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

«22» сентября 2021 г.

Официальный оппонент
Зав. лабораторией
экологической и эволюционной биохимии,
ФИЦ Биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук
по специальности 03.01.04 Биохимия



Дерябина Ю. И.

Контактные данные официального оппонента:

Почтовый адрес: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, Институт биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Контактный телефон: +7 (495) 954-40-08

Адрес электронной почты: yul_der@mail.ru

Подпись

Ю.И. Дерябиной удостоверяю

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН

Кандидат биологических наук

«22» сентября 2021 г.



Орловский А.Ф.