

ВІДЗИВ

офіційного опонента Нагорної Олени Олександрівни
на дисертаційну роботу Лінник Оксани Олександрівни

"Порушення мітохондріального апарату кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі: механізми та корекція", поданої на здобуття вченого ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю патологічна фізіологія - 14.03.04

Актуальність обраної теми дисертації.

В останні роки спостерігається зростання захворювань, які обумовлюють високі показники смертності. На першому місці захворювання серцево-судинної системи (атеросклероз, гіпертензія, ішемічна хвороба серця, інфаркт міокарду), онкологічна патологія, а також не менш тяжкі нейродегенеративні захворювання, цукровий діабет. Важливу роль в виникненні вищезазначених патологій пов'язують з оксидативним стресом. До розвитку оксидативного стресу з порушенням метаболічних процесів призводить надмірне утворення активних форм кисню ROS переважно в мітохондріях, що обумовлює розвиток мітохондріального стресу та дисфункції мітохондрій. Тому, останнім часом більше уваги приділяється вивченню ролі мітохондрій та їх геному в патогенезі серцево-судинних, онкологічних захворювань, механізмів дії лікарських засобів, які сприяють активізації вільно-радикального окиснення. В лікуванні широко розповсюдженої онкологічної патології застосовують протипухлинні антибіотики антрациклінового ряду, а саме: доксорубіцин, який входить до препаратів першої лінії. На відміну від побічних явищ інших протипухлинних антибіотиків антрацикліни поряд з терапевтичною дією, володіють значною токсичною дією на серцево-судинну систему, яка проявляється тахікардією, змінами на ЕКГ, що призводить до розвитку тяжкої серцевої недостатності. Доксорубіцин має найбільшу кардіотоксичність порівняно з іншими антрациклінами. Одним з провідних механізмів реалізації специфічної дії та розвитку кардіотоксичної дії антрациклінових антибіотиків є активація вільно-

радикального окиснення, що супроводжується змінами мітохондріального апарату. У зв'язку зі зростанням кількості хворих на онкологічні захворювання актуальним залишається вирішення питання попередження розвитку негативного впливу антрациклінових антибіотиків на серцево-судинну систему шляхом фармакологічної та нефармакологічної кардіопротекції. З цією метою необхідно встановити вплив доксорубіцину на мітохондріальний апарат кардіоміоцитів. Крім того, не було з'ясовано, якими шляхами відбувається загибель кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі і як це корелює з порушенням функціональної активності мітохондрій.

Хоча визначена роль транскрипційного протеїнового комплексу HIF у розвитку компенсаторних реакцій на гіпоксію, не був виявлений зв'язок між пригніченням експресії HIF та оксидативним пошкодженням кардіоміоцитів при введенні доксорубіцину.

Тому, надзвичайно важливим є відкриття транскрипційного протеїнового комплексу, який індукується гіпоксією (hypoxia-inducible factor, HIF). Він не є однорідним, впливає на широкий діапазон клітинних функцій, таких як еритрогенез, ангиогенез, гліколіз, метаболізм заліза, ріст, апоптоз та інші. Велике значення має з'ясування ролі гіпоксії-індукованого фактора HIF в клітинних та молекулярних механізмах фармакодинаміки доксорубіцину, вивчення впливу HIF на розвиток компенсаторних реакцій на нестачу кисню на тлі доксорубіцину та мобілізацію клітинної відповіді на нього, особливо при введенні куркуміну, в тому числі на підвищення продукції вільних радикалів кисню в мітохондріях.

Попередньо в якості кардіопротекторів, які можна включати в комплексну фармакотерапію з доксорубіцином були досліджені синтетичні антиоксиданти - нікотинамід, тіотриазолін, відсутні дослідження антиоксидантної дії рослинного препарату куркуміну, який з одного боку є менш токсичним, ніж синтетичні засоби, з другого за попередніми даними є ефективним антиоксидантом.

Тема дисертаційної роботи Лінник О.О., яка присвячена вивченню механізму порушень мітохондріального апарату кардіоміоцитів при

доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі та їх корекція куркуміном, є актуальною і своєчасною, тому що пов'язана не тільки із з'ясуванням патобіохімічних механізмів впливу антрациклінів, але є підґрунтям пошуку ефективних кардіопротекторів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності положень, висновків і рекомендацій, сформованих в дисертації.

Дисертаційна робота проведена на високому науково-методичному рівні, що дозволило виконати всі поставлені завдання. Експериментальні дослідження проведені на первинній культурі ізольованих кардіоміоцитів, виділених із шлуночків серця новонароджених щурів та статевозрілих щурах-самках. Автором чітко сформульовані мета та завдання дисертації. В роботі використанні функціональні, біохімічні, молекулярно-генетичні, цитологічні, біофізичні, статистичні методи дослідження. Визначена доза доксорубіцину, оптимальна для подальших досліджень, яка склала 0,5 мкМ, за допомогою МТТ-тесту. Дисертантом визначений дозозалежний вплив доксорубіцину на життєздатність клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів. Проведена корекція сумісним застосуванням доксорубіцину і куркуміну, що призвело до підвищення життєздатності клітин.

В подальшому проведена оцінка життєздатності неонатальних кардіоміоцитів, за допомогою МТТ-тесту, у контролі та за умов впливу доксорубіцину, куркуміну та доксорубіцину й куркуміну разом. Доксорубіцин викликав некроз кардіоміоцитів, а при поєднанні з куркуміном життєздатність клітин підвищувалась. Ці дані підтверджують кардіопротекторні властивості куркуміну.

Використовуючи флуоресцентний метод визначили значне пониження забарвлення мітохондрій під впливом доксорубіцину, що підтверджує пошкоджуючий вплив доксорубіцину на мітохондріальний апарат, сумісна інкубація клітин з куркуміном і доксорубіцином призводила до значного підвищення інтенсивності флуоресценції мітохондрій, що свідчило про здатність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних

кардіоміоцитів та підвищення вихідної величини мембранного мітохондріального потенціалу при оксидативному пошкодженні.

Доксорубіцин значно підвищував рівень вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів та понижував ферментативну активність Mn-SOD. Інкубація культури кардіоміоцитів з доксорубіцином та куркуміном значно знизила рівень вільних радикальних процесів та відновлювало активність антиоксидантного ферменту Mn-SOD.

Проведена оцінка під впливом доксорубіцину та при сумісному впливі з куркуміном змін параметрів дихання та фосфорилування мембранного потенціалу мітохондрій, виділених з неонатальних кардіоміоцитів. Результати свідчать про спроможність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів за рахунок своїх антиоксидантних властивостей та можливості підтримувати мітохондріальний потенціал.

Оцінені параметри дихання та фосфорилування в кардіоміоцитах дорослих щурів на тлі доксорубіцин-індукованного порушення процесів окисного фосфорилування в мітохондріях та проведена корекція куркуміном. Отже, дія куркуміну спрямована на запобігання пошкодженню клітин при оксидативному стресі.

В подальшому досліджено зміни рівнів експресії різних кисеньчутливих генів, проведено полімеразну ланцюгову реакцію з використанням виділеної РНК та ДНК. Доксорубіцин понижує експресію гену NIF-1a та його генів мішеней, при цьому підвищуючи експресію гену NIF-3a. Доксорубіцин понижував скорочувальну здатність неонатальних кардіоміоцитів, в сполученні з куркуміном підвищував скорочувальну активність, що пов'язано зі зменшенням оксидативного стресу. До сучасних та інформативних методів дослідження відносяться визначення рівня мітохондріального мембранного потенціалу за допомогою флуоресцентних барвників та комплексне дослідження скоротливості кардіоміоцитів.

Таким чином, всі наукові положення, сформульовані у дисертації, видаються достовірними та логічними.

Наукова новизна одержаних результатів.

Дисертантом вперше було проведено розгорнуте дослідження функціональних порушень мітохондріального апарату кардіоміоцитів щурів *in vitro* та *in vivo* та їх корекції за допомогою куркуміну за умов доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу у співставленні з показниками активності про- та антиоксидантної системи, а також експресії генів редокс-чутливих факторів транскрипції (HIF-1 α , PDK-1, TERT, IGF-1), що приймають участь у регуляції оксидативного стану мітохондрій.

Також важливим є те, що доксорубіцин є дієвим інгібітором експресії не тільки гену HIF-1 α , а і його важливих генів мішеней (PDK-1, TERT, IGF-1). Підтверджено зв'язок між HIF-залежними процесами та механізмами збільшення загибелі кардіоміоцитів різними шляхами при дії доксорубіцину і встановлено молекулярно-генетичні шляхи корекції доксорубіцин-індукованої мітохондріальної дисфункції в кардіоміоцитах за допомогою куркуміну. Значимою новизною дисертації Лінник О.О. є те, що сумісне застосування доксорубіцину та куркуміну в непухлинних клітинах (кардіоміоцити) значно покращує електронтранспортну функцію мітохондрій, посилює спряженість й ефективність процесів дихання та фосфорилування й запобігає пошкодженню клітин при оксидативному стресі. Не менш важливим є встановлення, що інкубація неонатальних кардіоміоцитів з куркуміном чи доксорубіцином окремо погіршує функціональний стан клітин. А сумісне застосування цих препаратів значно покращувало скорочувальну активність клітин, відновлювало їх ритмічність, амплітуду та відсоток вкорочення, що може бути пов'язано зі зменшенням проявів оксидативного стресу в кардіоміоцитах та свідчить про прояви захисного ефекту куркуміну лише при пошкодженнях міокарду та його ефективність як кардіопротектора.

Практичне значення одержаних результатів.

Одержані результати можуть мати практичне значення для розробки нових методів корекції оксидативного стресу та мітохондріальних порушень кардіоміоцитів при ряді патологічних станів (онкологічні, нейродегенеративні,

ішемічні захворювання, тощо). Крім того, розкриття молекулярних, генетично-детермінованих механізмів (зміна експресії гена HIF-1а та його генів-мішеней) розвитку та корекції оксидативних порушень мітохондрій може слугувати потенційно новим терапевтичним підходом до лікування хвороб людини, пов'язаних з оксидативним стресом різного генезу.

Результати дисертаційної роботи також можуть бути використані при викладанні фармакології та фармакотерапії у медичних вищих навчальних закладах.

Повнота викладення матеріалу в опублікованих роботах, авторефераті.

За темою дисертації опубліковано 16 наукових праць, серед них 6 статей - у рекомендованих ДАК України фахових журналах та 10 тез доповідей на конгресах, з'їздах, конференціях. Робота апробована на міжнародних та вітчизняних наукових конгресах і конференціях. Автореферат повністю відображує основні положення дисертаційної роботи.

Аналіз вмісту дисертації.

Дисертація побудована за загальноприйнятою схемою й містить усі необхідні розділи: анотацію, вступ, огляд літератури, опис методів досліджень, результати досліджень, аналіз й узагальнення результатів, висновки, список використаних джерел літератури, що включає 217 посилань. Робота викладена на 129 сторінках машинописного тексту, містить 2 таблиці, проілюстрована 28 рисунками. Огляд літератури складається з трьох підрозділів: мітохондріальна дисфункція та оксидативний стрес; роль транскрипційного фактора HIF в розвитку відповіді на пошкодження кардіоміоцитів щурів при моделюванні оксидативного стресу; можливості корекції різними методами, в кардіоміоцитах щурів, доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу.

В роботі використані функціональні, біохімічні, молекулярно-генетичні, цитологічні, полярографічні, біоінформативні та статистичні методи досліджень. В розділах дано вичерпний опис застосованих методик й об'єктів

дослідження.

В розділі третьому «Результати власних досліджень», спочатку дисертації, визначений дозозалежний вплив доксорубіцину на життєздатність клітин в культурі неонатальних кардіоміоцитів. За допомогою МТТ-тесту, який характеризує інтенсивність окисно-відновних процесів в клітинах культури була вибрана середня доза доксорубіцину 0,5 мкмоль як оптимальна для подальших досліджень.

Надалі в культурі неонатальних кардіоміоцитів був досліджений розподіл варіантів клітинної смерті у контролі та за умов впливу доксорубіцину, куркуміну та доксорубіцину й куркуміну разом. Сумісне застосування доксорубіцину і куркуміну підвищувало життєздатність клітин, а кількість загиблих різними шляхами клітин зменшувалась.

В подальшому проведена оцінка життєздатності неонатальних кардіоміоцитів, за допомогою МТТ-тесту, у контролі, за умов впливу доксорубіцину та корекції куркуміном. Проведена оцінка зміни рівня цитотоксичності доксорубіцину окремо, кількість живих клітин відносно контролю значно зменшилась. При корекції куркуміном, відсоток загиблих клітин зменшився порівняно з використанням лише доксорубіцину, що є підтвердженням кардіопротекторних властивостей куркуміну.

На далі, у контролі та за умов впливу доксорубіцину, куркуміну та доксорубіцину й куркуміну разом була досліджена скорочувальна активність неонатальних кардіоміоцитів. Результати проведених досліджень на культурі неонатальних кардіоміоцитів продемонстрували, що доксорубіцин викликає значні зміни всіх параметрів їх скорочувальної активності з контролем, змінюється частота спонтанних скорочень, порушується їх ритмічність. Сумісна інкубація з доксорубіцином і куркуміном відновлювала всі параметри скорочувальної активності неонатальних кардіоміоцитів. Це може бути підтвердженням зменшення проявів оксидативного стресу в кардіоміоцитах, за рахунок протективних та антиоксидантних властивостей куркуміну, а також підтверджує кардіопротекторну дію сполучення.

Проводилось також визначення кардіогемодинамічних показників у

щурів при доксорубіцин-індукованому оксидативному стресі порівнянно з контрольною групою та відміченні суттєві відмінності між досліджуваними групами тварин. Досліджувались показники про- та антиоксидантної системи у мітохондріях, виділених з неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів. Доксорубіцинова інтоксикація призводить до значного підвищення в кардіоміоцитах рівня вторинних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ТБК-АП) та перекису водню на відміну від контрольної групи. Це свідчить про інтенсифікацію вільно-радикальних процесів та зміни у структурній організації клітин міокарду. Додавання куркуміну до культури кардіоміоцитів при доксорубіциновій інтоксикації мало позитивний коригуючий вплив на вільно-радикальні процеси та антиоксидантний захист.

Аналогічні результати були отримані при введенні доксорубіцину і куркуміну щурам *in vivo*. Таким чином, результати дослідження розвитку доксорубіцин-індукованого оксидативного стресу в мітохондріях кардіоміоцитів свідчать про його гальмування при застосуванні куркуміну як у модельних експериментах *in vitro*, так і при введенні тваринам *in vivo*.

Проведена оцінка змін параметрів дихання і фосфорилування мітохондрій, виділених з неонатальних кардіоміоцитів та з міокарду щурів. Виявлений пошкоджуючий вплив доксорубіцину на мітохондріальний апарат. В той же час, після застосування доксорубіцину з куркуміном показники мітохондріального дихання покращувалися порівняно із такими при використанні лише доксорубіцину. Це свідчить про спроможність куркуміну підвищувати життєздатність культури неонатальних кардіоміоцитів за рахунок своїх антиоксидантних властивостей, можливості підтримувати мітохондріальний потенціал та запобігання пошкодженню клітин при оксидативному стресі.

При дослідженні експресії гіпоксій-індукованого фактора HIF-1 α і його генів-мішеней в культурі неонатальних кардіоміоцитів щурів та в міокарді щурів відмічено значне зниження рівня мРНК HIF-1 α в усіх групах: при введенні доксорубіцину та куркуміну у монорежимі (порівняно з контролем). А при їх поєднаному впливі експресія HIF-1 α знизилась вдвічі порівняно з

додаванням лише доксорубіцину. Це підтвердження здатності доксорубіцину і куркуміну інгібувати експресію мРНК HIF-1a, що є важливим при ракових захворюваннях. У випадку доксорубіцин-індукованого стресу в неракових клітинах, це є підтвердженням значних антиоксидантних властивостей куркуміну.

На рівні системи HIF-1 показано, що доксорубіцин є дієвим інгібітором не тільки гену HIF-1a, а і його генів-мішеней. Механізм збільшення загибелі кардіоміоцитів різними шляхами при дії доксорубіцину теж пов'язаний з He-залежними процесами. Дисертантом показано, що куркумін володіє подвійним ефектом: з одного боку, він має значні антиоксидантні властивості, які виявляються і на генному рівні (підвищення експресії генів PDK-1 і TERT), на тлі доксорубіцинової інтоксикації. З другого боку введення куркуміну значно інгібує експресію мРНК HIF-1a, підвищуючи проапоптичний ефект доксорубіцину, що є важливим фактором протипухлинної терапії.

Запитання до дисертації і автореферату щодо їх змісту й оформлення.

Позитивно характеризуючи дисертацію в цілому, у мене як опонента виник ряд запитань, які хотілося би обговорити з дисертантом у порядку дискусії:

1. В дисертаційній роботі ви вивчали вплив доксорубіцину на параметри кардіогемодинаміки. А чому не досліджували вплив куркуміну на фоні доксорубіцинового оксидативного стресу?
2. Чи можуть доксорубіцин та куркумін взаємодіяти між собою, нейтралізувати один одного?
3. Які ще речовини можуть вважатися кардіопротекторами при доксорубіциновій інтоксикації?
4. Чому дослідження проводили на різних лініях щурів?

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Дисертація Лінник Оксани Олександрівни "Порушення мітохондріального апарату кардіоміоцитів при доксорубіцин-індукованому

оксидативному стресі: механізми та корекція", являє завершене дослідження, з використанням достатньої кількості експериментального матеріалу, на високому науково- методичному рівні, містить наукову новизну та практичне значення. Таким чином, за актуальністю проблеми, науковою новизною, методичним рівнем та практичною значимістю дисертаційна робота Лінник Оксани Олександрівни повністю відповідає вимогам п.13 „Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вчених звань” МОН України, а її автор заслуговує присвоєння наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 - патологічна фізіологія.

05.02.2018 р.

Доцент кафедри фармакології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця, к.мед.н.,


О.О. Нагорна
