

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Лучкової Аліни Юріївни «Роль сірководню у регуляції кальцієвого гомеостазу та функцій мітохондрій серця щурів в нормі та при старінні», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

1. Актуальність теми

Гра на випередження – усунути небезпеку ще до того, як вона стане реальною. Такий принцип лежить в основі найуспішніших стратегій поведінки живих систем різних рівнів організації. Немає потреби (та й небезпечно) завжди продукувати велику кількість АТФ у кардіоміоцитах – і у стані фізіологічного спокою, коли серце перекачує 5 л крові за хвилину, і під час навантаження, коли потік зростає до 30 л. Достатньо інтенсифікувати мітохондріальне дихання і окисне фосфорилування безпосередньо перед тим, як інтенсифікуються енерговитрати.

Механізм цього випереджувального зв'язку закладений у самому механізмі внутрішньоклітинної трансдукції сигналу. Катіони Ca^{2+} , запускаючи скорочення, інтенсифікують окисні процеси у мітохондріях ще до того, як концентрація АТФ знизиться. Але ці ж самі катіони відіграють ключову роль не лише в адаптації мітохондріального дихання і, відтак, у збереженні життя організму, а й у розвитку патологічних процесів, що закінчуються його смертю.

Порушення коронарного кровотоку призводить до порушення мітохондріального дихання, швидкого зниження рівня АТФ та підвищення цитозольної концентрації Ca^{2+} , що в сукупності спричиняє розвиток некрозу. Для запобігання некрозу важливо якнайшвидше відновити кровообіг. Проте реперфузія зумовлює не менш серйозні пошкодження, пов'язані з активацією пори транзієнтної проникності мітохондрій. Парадоксально, але відновлення постачання кисню до кардіоміоцитів збігається з поверненням до нейтрального рН, поглинанням Ca^{2+} мітохондріями з цитозолу, подальшою активацією утворення активних форм кисню, які і ушкоджують кардіоміоцити. Усе це разом сприяє відкриванню пори транзієнтної проникності мітохондрій.

Потрібна система, яка б унеможливила такий сценарій розвитку подій. І претендентом на цю роль є сполука, яка відносить до газотрансмітерів, – сірководень. Відомо, що він є вазодилататором, має виражені антиоксидантні

властивості через підвищення активності Mn- та Cu-супероксиддисмутаза, спричиняє зниження активних форм кисню, стимулює ангіогенез, пригнічує індукцію каспази-3 та активацію пори транзієнтної проникності тощо. Але як змінюється система сірководню під час старіння організму, коли ризик розвитку інфаркту міокарда зростає – залишається актуальною проблемою серцево-судинної фізіології, клітинної фізіології, біоенергетики, патофізіології та кардіології.

Актуальність дисертації підтверджується ще й тим, що вона виконана в рамках науково-дослідних проєктів Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України «Вивчення впливу сірководню на діяльність серця, судинний тонус і функціональний стан мітохондрій» (2010–2013, № держреєстрації 0107U005336), «Дослідження ролі сигнальних сполук сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму» (2014–2018, № держреєстрації 0113U007276).

Нижче, відповідно до вимог МОН України і на підставі вивчення дисертації, автореферату дисертації та праць здобувача, опублікованих за темою дисертації, наводжу своє бачення найсуттєвіших науково-теоретичних та практичних аспектів кандидатської дисертації Лучкової Аліни Юріївни.

2. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Про високий ступінь обґрунтованості основних положень дисертації свідчить, насамперед, те, що дослідження проведені на достатній вибірці, цифрові дані були опрацьовані статистично, достовірність різниці між середньоарифметичними показниками перевіряли за t-критерієм Стюдента для параметричної вибірки та Манна-Вітні для непараметричної вибірки. У ході дослідження були коректно використані адекватні поставленій меті і завданням дисертації методи – метод виділення мітохондрій методом диференційного центрифугування, метод дослідження рівня іонізованого Ca^{2+} у матриксі мітохондрій з використанням Fluo-4 AM та проточного цитофлуориметра, метод дослідження активності мітохондріальної пори за допомогою спектрофотометричної реєстрації набухання мітохондрій, метод полярографічного дослідження дихання мітохондрій, метод перфузії коронарних судин ізольованого серця щурів за методом Лангендорфа та реєстрація скоротливої активності лівого шлуночка, а також біохімічні методи та методи

статистично-математичної обробки даних. Це досить трудомісткі методи, і їхнє застосування свідчить про високу кваліфікацію дисертанта як дослідника-експериментатора, який здатний вирішувати складні методичні наукові проблеми серцево-судинної фізіології, клітинної фізіології і біоенергетики.

Об'єктивність результатів досліджень і висновків, наведених у дисертації, підтверджується фактичним матеріалом, який наводиться у експериментальній частині роботи, та ґрунтовністю його аналізу. Суттєво полегшує сприймання фактичного матеріалу і проведення його наукової експертизи ілюстративний матеріал, представлений на 32 рисунках та 5 таблицях (у всіх розділах дисертації).

Дисертант критично підійшла до обговорення даних наукової літератури і результатів власних досліджень, що дає підстави говорити про її наукову обізнаність та здатність орієнтуватися у сучасних проблемах серцево-судинної фізіології, клітинної фізіології і біоенергетики.

Основні положення дисертації були апробовані на 8-и наукових форумах в Україні та закордоном (Kyiv, 2015; Florence, 2016; Одеса, 2017; Алматы, 2017; Jerusalem, 2017; Munich, 2018; Athens, 2019; Nice, 2019), що переконує у доцільності таких досліджень і значенні отриманих результатів.

Отже, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, наведених у рецензованій дисертації, є високим, а Лучкова Аліна Юріївна обізнана з результатами основних наукових досліджень, вміє критично аналізувати наукові факти, інтерпретувати їх, що дозволило їй адекватно вирішити поставлену наукову проблему.

3. Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації

Результати аналізу фактичних даних, наведених у кандидатській дисертації Лучкової Аліни Юріївни, їхнього взаємозв'язку і причинно-наслідковості переконливо свідчать про те, що вони є достовірними.

Отримані дисертантом наукові результати є новими і пріоритетними. Найбільш цінними, на мій погляд, є такі експериментальні дані.

Показано, що інгібування ферменту 3-MPST, який забезпечує синтез сірководню у мітохондріях, призводить до порушення роботи серця, зниження

показників серцевої динаміки, зокрема тиску в лівому шлуночку серця, швидкості скорочення та розслаблення, а також інтенсивності скоротливої функції та зниження стійкості до кальцієвих навантажень. Також з'ясовано, що за умов пригнічення синтезу сірководню зростали такі показники окисного стресу, як рівень супероксидного та гідроксильного радикалу, а також посилювалися процеси перекисного окиснення ліпідів та збільшення активності iNOS (на тлі зменшення функціональної активності sNOS) як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів. Виявлено, що екзогенний сірководень підвищує акумуляцію Ca^{2+} в мітохондрії серця дорослих та старих щурів в умовах кальцієвого навантаження і запобігає активації пори транзієнтної проникності у мітохондріях кардіоміоцитів серця дорослих та старих щурів. У той же час пригнічення ендогенного утворення сірководню знижувало поріг чутливості мітохондріальної пори транзієнтної проникності до Ca^{2+} та підвищувало набухання мітохондрій серця дорослих та старих щурів. Пригнічення мітохондріального синтезу сірководню знижувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялася у зменшенні швидкості споживання кисню у станах S_2 , S_3 та S_4 .

Отримані результати безсумнівно є важливими для подальших досліджень особливостей сигналізації у кардіоміоцитах, а тому є цінними для клітинних фізіологів, біоенергетиків, кардіологів тощо.

4. Запитання, зауваження та рекомендації з боку опонента

Вважаючи, що кандидатська дисертація Лучкової Аліни Юріївни має високий теоретичний і методичний рівень, я хочу зробити деякі зауваження і задати декілька дискусійних питань дисертанту стосовно оформлення дисертації та автореферату, фактичного матеріалу та інтерпретації отриманих результатів:

1. Текст дисертації та автореферату написаний гарною мовою, послідовний, логічний і одночасно інформативний. Але містить невелику кількість помилок редакційного характеру та недоречне використання деяких термінів, на зразок, «Активні форми азоту», «Активні форми кисню», «Пейсмейкерні клітини ... *індукують* потенціал дії», «Рухаючись між саркомерами, ПД ...», «Головки [міозину] ... *штовхають* актинові філаменти», «кальцій в цитоплазмі відразу ж *забуферюється*», «концентрація *внутрішньоклітинного* кальцію», «окисне

фосфорилування, в процесі якого *генерується енергія АТФ*», «регуляція іонів Ca^{2+} і P^+ [?] в клітині» тощо.

2. Для коректної інтерпретації експериментальних даних, отриманих на ізольованих мітохондріях, важливо знати, чи використовували екзогенні субстрати окиснення та субстрат фосфорилування, які використовували субстрати окиснення і використовували у яких концентраціях. Склади розчинів наведені лише у Розділі 2 «Об'єкт, матеріали та методи дослідження», що спричиняє певні незручності для аналізу та порівняння результатів різних серій дослідження.
3. Характеризуючи залежність інтенсивності скоротливої функції серця від концентрації Ca^{2+} у середовищі (рис. 3.2, г), ви звертаєте увагу, що максимальна інотропна стимуляція серця у контрольних тварин спостерігалася за 7,5 ммоль/л CaCl_2 , тоді як у дослідних тварин (за дії інгібітора 3-меркаптопіруват сульфуртрансфери O-CMN) – коли концентрація CaCl_2 становила 5 ммоль/л. Це свідчить, на вашу думку, про зниження функціональних резервів міокарда у тварин за умов пригнічення синтезу сірководню. А про що свідчить суттєве зниження інтенсивності скоротливої функції серця у контрольних тварин за вищих концентрацій Ca^{2+} ? І відсутність цього зниження у дослідних тварин?
4. Чи враховували ви у ході дослідження акумуляції Ca^{2+} мітохондріями, що вміст іонізованого Ca^{2+} у матриксі мітохондрій є інтегральним показником функціональної активності усіх Ca^{2+} -транспортних систем, у т.ч. кальцієвого уніпортера, мітохондріальних ріанодинових рецепторів, Na^+ - Ca^{2+} - чи H^+ - Ca^{2+} -обмінника, пори транзійної проникності? Чи використовували специфічні інгібітори цих систем?

Проте ці зауваження і питання не мають принципового значення і суттєво не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

5. Повнота викладу наукових положень, висновків і рекомендацій, які сформульовані у дисертації, в опублікованих працях

Наукові положення, висновки і рекомендації повністю висвітлені у 13 наукових публікаціях, в тому числі у 6 статтях (з них усі 6 – у Фізіологічному журналі, дві з яких проіндексовані у наукометричній базі Scopus (Author ID:

57191340545), причому одна з них має 4 цитування), що є свідченням високого рівня отриманих результатів.

6. Щодо відповідності встановленим вимогам

Дисертаційне дослідження Лучкової Аліни Юріївни є завершеною, самостійно виконаною науковою працею, в якій отримано нові науково-обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу і є важливими для серцево-судинної фізіології, клітинної фізіології, біоенергетики і патофізіології. Науковий зміст автореферату відповідає науковим положенням дисертації.


7. Важливість для науки і народного господарства одержаних автором результатів. Рекомендації щодо їхнього використання

У науково-теоретичному відношенні результати дисертаційної роботи Лучкової Аліни Юріївни є важливими, оскільки отримано принципово нові дані щодо механізму дії сірководню у мітохондріях серця щурів і виявляють важливість сірководню, синтезованого у мітохондріях, для нормального функціонування серця. Крім того, вважаю за доцільне використання основних положень дисертації під час читання лекцій із нормативних курсів «Фізіологія людини і тварин» та «Патофізіологія», а також таких спеціальних курсів закладів вищої освіти, як «Фізіологія серцево-судинної системи», «Клітинна фізіологія», «Біоенергетика», «Кардіологія» тощо.

8. Висновок

Кандидатська дисертація Лучкової Аліни Юріївни є актуальним і фундаментальним дослідженням у галузі серцево-судинної фізіології, клітинної фізіології, біоенергетики і патофізіології. У ході виконання цієї роботи були отримані вагомі наукові результати щодо ролі сірководню у регуляції мітохондріальних процесів у кардіоміоцитах. Ці результати є фундаментальними і важливими. За рівнем наукової новизни ці результати відповідають вимогам, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук. Тема роботи, об'єкт та предмет дослідження, її зміст, а також положення та висновки відповідають паспорту спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. У дисертаційній роботі містяться раніше незахищені наукові положення.

Отже, дисертаційна робота відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р., № 567 (із змінами), які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор Лучкова Аліна Юріївна повністю заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент –
завідувач кафедри фізіології людини і тварин
Львівського національного університету імені Івана Франка
доктор біологічних наук, професор  В.В. Манько

8.06.2020 р.

Підпис професора Манька В.В. засвідчую.

Вчений секретар

Львівського національного університету

імені Івана Франка, доцент

О.С. Грабовецька