

## **ВІДГУК**

**офіційного опонента на дисертаційну роботу**

**ЛУЧКОВОЇ АЛІНИ ЮРІЇВНИ**

### **«РОЛЬ СІРКОВОДНЮ ( $\text{H}_2\text{S}$ ) У РЕГУЛЯЦІЇ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ»,**

що подана до спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології імені О.О. Богомольця для здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.13 –фізіологія людини і тварин.

### **АКТУАЛЬНІСТЬ ОБРАНОЇ ТЕМИ ДИСЕРТАЦІЇ**

Дисертаційне дослідження Аліни Юріївни Лучкової «РОЛЬ СІРКОВОДНЮ ( $\text{H}_2\text{S}$ ) У РЕГУЛЯЦІЇ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ», подане на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, спрямоване на дослідження фундаментальних механізмів регуляції кальцієвого ( $\text{Ca}^{2+}$ ) гомеостазу в кардіоміоцитах ендогеннопродукованим газовим трансмітером сірководнем ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Сьогодні про роль  $\text{H}_2\text{S}$  в забезпеченні клітинних функцій різних тканин, в тому числі регуляції кальцієвого гомеостазу у мітохондріях клітин серця, мало відомо. Незважаючи на сприятливі ефекти донорів сірководню, які широко використовуються в експериментальних дослідженнях для корекції ішемічних станів, запальних чи вільнорадикальних процесів, роль ендогенного  $\text{H}_2\text{S}$  залишається не з'ясованою. Наявність фермента синтезу  $\text{H}_2\text{S}$  в мітохондріях вказує на його важливу фізіологічну роль в цих органелах, дослідженню якої і присвячена робота Лучкової А.Ю.

Необхідність вивчення впливу  $\text{H}_2\text{S}$  на кальцієвий гомеостаз, зумовлена важливістю йонів  $\text{Ca}^{2+}$  у здійсненні регуляції багатьох клітинних функцій, починаючи від синтезу АТФ до апоптозу клітин. В кардіоміоцитах ефективність кальцієвих потоків, а саме переміщення йонів  $\text{Ca}^{2+}$  під час діастолі з цитоплазми в депо (ЕПС і мітохондрії), є важливим чинником забезпечення дилатаційної і насосної функції міокарда, а в клітинах гладеньких м'язів судин відкачування  $\text{Ca}^{2+}$  з цитоплазми забезпечує зниження тонуусу судин і, відповідно, сприяє кровонаповненню органів і кінцівок. Однак тривале підвищення його вмісту в матриксі мітохондрій призводить до відкривання мітохондріальних пор неспецифічної проникності (МП), зниженням продукції АТФ, що є

критичною подією у розвитку апоптозу і загибелі клітин. Відомо також, що вхід  $\text{Ca}^{2+}$  в органели підвищується при старінні, а МП утворюється при нижчих концентраціях  $\text{Ca}^{2+}$ . Саме перевантаження йонами  $\text{Ca}^{2+}$  лежить в основі збільшення жорсткості судин і міокарда при старінні, збільшення загального периферичного опору судин і розвитку гіпертонії. Також при старінні значно підвищується генерація активних форм кисню і азоту в клітинах, які теж є індукторами МП. Порушення кальцієвого гомеостазу, інтенсифікація вільнорадикальних процесів в результаті значно відображаються на функції серця, резистентості міокарда до пошкоджуючої дії несприятливих чинників та навантажень різного генезу. Таким чином, дана дисертаційна робота є актуальним дослідженням, присвяченим важливій науковій проблемі – дослідженню регуляторного впливу  $\text{H}_2\text{S}$  мітохондріального походження на структурно-функціональний стан мітохондрій серця, функціональних резервів серця, процеси енергосинтезу та регуляторні механізми систем різних рівнів в нормі та при старінні.

Необхідно зауважити, що обрано достатньо складний аспект дослідження, а саме старіння як фізіологічний стан, оскільки при старінні активуються процеси перекисного окиснення ліпідів, порушується баланс між про- та антиоксидантними системами, пошкоджуються ліпідні, білкові компоненти в складі клітинних мембран, в тому числі і каналні структури, якими є МП, рецептори, кальцієві канали та ін. На фоні таких змін знижуються резервні можливості організму, розвиваються хвороби, які мають поліфакторну етіологію, в силу чого їх прийнято об'єднувати в групу вік-асоційованих захворювань. Разом з тим, обрана тема досліджень має важливе прикладне значення, оскільки розуміння молекулярних механізмів змін в мітохондріях і ролі  $\text{H}_2\text{S}$  в цих змінах дозволить запропонувати методи корекції функцій серцево-судинної системи при розвитку вік-асоційованих порушень.

### **ЗВ'ЯЗОК ТЕМИ ДИСЕРТАЦІЇ З ДЕРЖАВНИМИ ЧИ ГАЛУЗЕВИМИ НАУКОВИМИ ПРОГРАМАМИ**

Дисертаційна робота виконувалась в рамках науково-дослідних робіт відділу фізіології кровообігу Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця «Вивчення впливу сірководню на діяльність серця, судинний тонус і функціональний стан мітохондрій», 2010-2013рр. (№ держреєстрації 0107U005336) та «Дослідження ролі сигнальних сполук



сірки в реакціях серцево-судинної системи щурів при різних станах організму», 2014-2018pp. (№ держреєстрації 0113U007276).

### **СТУПІНЬ ОБҐРУНТОВАНOSTІ ПОЛОЖЕНЬ, ВИСНОВКІВ ТА РЕКОМЕНДАЦІЙ, СФОРМУЛЬОВАНИХ У ДИСЕРТАЦІЇ, ЇХ ДОСТОВІРНІСТЬ І НОВИЗНА, ПОВНОТА ВИКЛАДЕННЯ В ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЯХ**

Дисертація А.Ю.Лучкової є завершеною науковою роботою, яка відкриває перспективу майбутніх досліджень. Автором дуже детально проаналізовано сучасний стан проблеми. Опрацювавши більше 170 джерел літератури, нею сформульовано проблематику з досліджень ролі ендогенного сірководню, поставлено мету і завдання. Використаний в роботі методичний підхід, а саме постановка експериментальних досліджень з метою виявлення ролі ендогенного сірководню в регуляції кальцієвого гомеостазу мітохондрій серця з використанням його донорів та блокаторів його синтезу, відповідає сучасній науковій парадигмі. Перевагою роботи є залучення автором сучасних фізіологічних, біохімічних і біофізичних методик, що дозволили отримати дані на кількох рівнях: молекулярному, клітинному, органному. Фактичний матеріал отримано на великій кількості відтворюваних експериментів. Використані коректні методи статистичної обробки отриманих даних, що дало можливість сформулювати адекватні висновки стосовно ролі  $H_2S$  мітохондріального походження у регуляції роботи дихального ланцюга, кальцієвої ємності мітохондрій, редокс-статусу і резервних можливостей серця у дорослих і старих тварин.

Винесені на захист положення ґрунтуються на аналізі матеріалів власних досліджень, володіють науковою новизною і пріоритетністю. Зокрема пошукачем вперше було показано, що інгібування ферменту синтезу  $H_2S$  3-MPST, який знаходиться, переважно в мітохондріях, призводило до порушення роботи серця, зниження показників кардіодинаміки, зокрема тиску в лівому шлуночку, швидкості скорочення та розслаблення, а також інтенсивності скоротливої функції. При цьому серця дослідних тварин не витримували кальцієвих навантажень. Також з'ясовано, що за умов пригнічення синтезу сірководню зростали показники окисного стресу, такі як супероксидний та гідроксильний радикали, відбувалося посилення перекисного окиснення ліпідів та збільшення активності iNOS на тлі зменшення функціональної активності cNOS як в мітохондріях серця, так і в плазмі крові дослідних щурів. Вперше виявлено, що екзогенний сірководень ( $10^{-6}$ - $10^{-7}$  моль/л) підвищує вхід  $Ca^{2+}$  в мітохондрії серця дорослих та старих щурів в умовах кальцієвого навантаження, при цьому він ( $10^{-5}$  моль/л NaHS)

попереджає відкривання мітохондріальної пори в органелах серця дорослих та старих щурів, що свідчить про регуляцію сірководнем транспорту  $\text{Ca}^{2+}$  у мітохондріях та важливе фундаментальне значення цього положення. У той же час, пригнічення ендogenousного утворення  $\text{H}_2\text{S}$  *in vivo* знижувало поріг чутливості МП до  $\text{Ca}^{2+}$  та підвищувало амплітуду набрякання мітохондрій серця дорослих та старих щурів за дії інгібітора *in vitro*. Вперше показано, що пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню *in vivo* знижувало функціональну здатність електронно-транспортного ланцюга мітохондрій, яка проявлялась у зменшенні швидкості споживання кисню у станах  $V_2$ ,  $V_3$  та  $V_4$ , а також показників дихального контролю та АДФ/О за Чансом.

Матеріали роботи були представлені та обговорені на українських та міжнародних наукових форумах (7 тез), а також оформлені в достатній кількості публікацій (6 статей).

Таким чином, положення, що виносяться на захист, володіють новизною, достовірністю і в повній мірі представлені в наукових публікаціях.

## ТЕОРЕТИЧНЕ І ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В результаті аналізу основних положень дисертації необхідно відмітити, що дана наукова робота характеризується широтою наукових поглядів, науково-практичних результатів та в певній мірі випереджає свій час. Отримані в роботі результати мають, в першу чергу, фундаментальний характер, оскільки розкривають нові механізми дії ендogenousного  $\text{H}_2\text{S}$  у мітохондріях серця щурів і виявляють важливість  $\text{H}_2\text{S}$ , синтезованого у мітохондріях, для нормального перебігу внутрішньоклітинних процесів, клітинного дихання, кальцієвого гомеостазу, функціонування серця. Результати доповнюють існуючі відомості про властивості  $\text{H}_2\text{S}$  як регуляторної молекули, дозволяють сформулювати уявлення про значення саме мітохондріального  $\text{H}_2\text{S}$  та підтверджують необхідність його утворення в мітохондріях, особливо з віком. Отримані дані можна використовувати при підготовці лекцій чи спеціалізованих курсів з клітинного сигналювання чи фізіології серцево-судинної системи та її регуляції біологічними молекулами і газовими трансмітерами зокрема. Більше того, отримані результати мають не лише теоретичну новизну, але й практичне значення і перспективу подальшого використання в клінічній практиці, оскільки можуть бути використані для розробки нових препаратів, які б впливали на синтез мітохондріального  $\text{H}_2\text{S}$  і застосовувались при корекції порушень роботи серцево-судинної системи, пов'язаних із недостатністю  $\text{H}_2\text{S}$ , зокрема при вік-асоційованих захворюваннях.



## ОЦІНКА ЗМІСТУ ДИСЕРТАЦІЇ, ЇЇ ЗАВЕРШЕНОСТІ ТА ІДЕНТИЧНОСТІ ЗМІСТУ АВТОРЕФЕРАТУ Й ОСНОВНИХ ПОЛОЖЕНЬ ДИСЕРТАЦІЇ

Дисертаційна роботи Лучкової А.Ю. оформлена відповідно до «Основних вимог до дисертацій та авторефератів дисертацій» ДАК України. Рукопис побудований за класичною схемою і складається з трьох розділів (огляду літератури, методів досліджень, результатів та їх обговорення), узагальнень і висновків. Роботу викладено на 143 сторінках та ілюстровано 30 рисунками і 2 таблицями.

У вступі, який викладено на 6 сторінках, містяться всі складові, рекомендовані ДАК України: обґрунтування актуальності дисертації; зв'язок роботи з науковими темами відділу; формулювання мети та завдань дослідження; визначення об'єкту, предмету і перелік використаних методів дослідження зі стислою конкретизацією необхідності їх застосування; наукова новизна отриманих результатів та їх практичне значення; особистий внесок здобувача; перелік наукових форумів, де були апробовані основні положення роботи; перелік публікацій дисертантки за матеріалами дисертації. Автор поряд з описом сучасного стану і актуальності вирішуваних питань чітко окреслює мету та п'ять завдань своєї роботи.

В огляді літератури детально описано участь кальцію в молекулярних механізмах роботи кардіоміоцитів при скороченні-розслабленні міокарда, класичні й альтернативні канали, транспортери і режими руху кальцію з/в клітину та з/в мітохондрії, механізми і особливості кальцієвої ємності мітохондрій за нормальних і патологічних умов, вплив кальцію на процеси, які відбуваються в мітохондріях – ЦТК, перенос електронів в ЕТЛ, фосфорилування АДФ АТФ-синтазою, підтримання мембранного потенціалу. Окремої уваги заслуговує ретельний огляд впливу йонів кальцію на утворення мітохондріальних пор транзитної проникності, відкриття яких є критичною подією в ініціації апоптозу. Літературний аналіз містить найновіші дані про регуляторні сингальні молекули – газотрансмітери, зокрема сірководень. Описані шляхи його синтезу та катаболізму, механізми його дії, важливість його для серцево-судинної системи, ангіогенезу, та попередження окисного стресу. Зроблений особливий акцент на мітохондріальний шлях синтезу  $H_2S$  і його роль у функціонуванні мітохондрій, про яку мало відомо.

В результаті, огляд літератури дисертації є інформативним, повним, грамотно і цікаво викладений. Підсумком огляду є висновок про необхідність досліджень впливу  $H_2S$  на процеси кальцієвого гомеостазу і його участь в регуляторних механізмах роботи серця.

В розділі 2 «Матеріали і методи дослідження» ретельно описані методики з характеристикою досліджуваних показників. Комплекс методів, за допомогою яких

вирішувались поставлені завдання, був спрямований на з'ясування ролі мітохондріального  $\text{H}_2\text{S}$  на функції мітохондрій і скоротливу активність міокарда, а саме в роботі застосовували блокатор мітохондріального фермента синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ , з використанням методик дослідження мітохондріального дихання за допомогою системи Oxgraph+, дослідження мембранного потенціалу мітохондрій, відкривання мітохондріальної пори, вивчення акумуляції кальцію ізольованими мітохондріями з використанням кальційчутливого зонду, досліджували скоротливу функцію ізольованого серця щурів. Обрані методики є адекватними, сучасними і охоплюють різні функціональні рівні, а дані отримані за їх допомогою доповнюють і пояснюють одне одного.

Розділ 3 «*Результати та їх обговорення*» містить результати власних досліджень Лучкової А.Ю., які показали, що блокатор синтезу мітохондріального  $\text{H}_2\text{S}$  зменшує вміст  $\text{H}_2\text{S}$  в мітохондріях дорослих щурів, пригнічує скоротливу активності міокарда, зменшує здатність міокарда утилізувати надлишок кальцію, а також посилює маркери окисно-нітрозативного стресу в мітохондріях серця і плазмі крові піддослідних тварин, підтверджуючи важливість мітохондріального синтезу  $\text{H}_2\text{S}$ .

Вивчався вплив екзогенного і роль ендогенного сірководню в процесах накопичення кальцію мітохондріями. Автором показано, що вплив донора сірководню ( $\text{NaHS}$ ) на кальційакумулювальну здатність мітохондрій був дозозалежним, при цьому  $\text{NaHS}$  у концентрації  $10^{-7}$  моль/л найбільш ефективно сприяв входу  $\text{Ca}^{2+}$  в органели. Отриманий результат свідчить про важливу роль  $\text{H}_2\text{S}$  у регуляції кальцієвого гомеостазу в клітинах серця, оскільки для розслаблення серцевого м'яза потрібно, щоб кальцій був вилучений з цитозолу, а мітохондрії належать до органел, які його депонують. Крім того, зростання кальційакумулювальної здатності мітохондрій в результаті впливу  $\text{NaHS}$  може бути наслідком інгібування сірководнем МП, яка бере участь також і у фізіологічній регуляції вмісту катіона в органелах. За умов преінкубації суспензії органел з інгібітором мітохондріального ферменту синтезу сірководню O-CMN ( $10^{-3}$  моль/л) вірогідно знижувалась акумулювальна і, ймовірно, кальцієва ємність мітохондрій, що проявлялось у зниженні вмісту кальцію в мітохондріях до кінця експерименту.

Важливим етапом досліджень є вивчення ролі мітохондріального  $\text{H}_2\text{S}$  при старінні. Донор сірководню  $\text{NaHS}$  посилював вхід катіона в органели у концентраціях  $10^{-6}$  і  $10^{-7}$  моль/л максимально на 14 і на 22 % відповідно і стимулював акумуляцію кальцію в мітохондріях лише в низьких досліджуваних концентраціях, а підвищення концентрації



H<sub>2</sub>S вище фізіологічних пригнічувало накопичення катіона. Інгібування ендogenous H<sub>2</sub>S не сприяло акумуляції кальцію мітохондріями, що вказує на регулювання Ca<sup>2+</sup>-транспортуючих систем органел за фізіологічних умов.

Автром показаний зв'язок між мітохондріальним H<sub>2</sub>S і стійкістю мітохондрій до набрякання у відповідь на дію кальцію, тобто утворення мітохондріальних пор транзитornoї провідності: пригнічення мітохондріального синтезу H<sub>2</sub>S значно збільшувало чутливість до дії йонів кальцію. Більше того автор показала NO-залежний характер регуляції мітохондріальних функцій сірководнем, а саме дихання (показники за Чансом, Ларді), формування мембранного потенціалу.

В заключному розділі автор наводить обговорення результатів дослідження, яке дозволило вплести їх в існуючу картину і зробити аргументовані висновки, які сформульовані достатньо чітко, переконливо і відповідають меті та завданням дисертаційної роботи. Представлені автором висновки відображають основні результати роботи.

### **ПИТАННЯ, ЩО ВИНИКЛИ ПРИ ОЗНАЙОМЛЕННІ З ДИСЕРТАЦІЄЮ**

При розгляді змісту дисертації та автореферату Лучкової А.Ю. виникли наступні питання:

1. В дослідженнях використовували лише шурів самців. Чим це обумовлено?
2. Чому з віком зменшується синтез мітохондріального сірководню? Яким чином можна запобігти цьому зменшенню?
3. Чому в експериментах NaHS, підвищує вхід кальцію у мітохондрії, але при цьому кальцій не індукує МП?
4. Чи бувають стани організму, за яких концентрація сірководню підвищена?
5. У роботі показано, що за дії NaHS у концентраціях (10<sup>-6</sup> і 10<sup>-7</sup> моль/л) помірно підвищувався вхід Ca<sup>2+</sup> в органели, тоді як у високій концентрації NaHS (10<sup>-4</sup> моль/л) частково пригнічувалася акумуляція катіона. Чим це можна пояснити?

Разом з тим, висловлені мною запитання не впливають на загальну позитивну оцінку роботи та не зменшують її наукову та практичну важливість.


## ВИСНОВОК ПРО ВІДПОВІДНІСТЬ ДИСЕРТАЦІЇ

### ВСТАНОВЛЕНИМ ВИМОГАМ

Дисертаційна робота Аліни Юріївни Лучкової «РОЛЬ СІРКОВОДНЮ ( $H_2S$ ) У РЕГУЛЯЦІЇ КАЛЬЦІЄВОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ СЕРЦЯ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук, за своєю актуальністю і значимістю отриманих результатів є самостійним, оригінальним, завершеним науковим дослідженням, яке за науковою новизною, теоретичним та практичним значенням робить вагомий внесок в розвиток сучасної фізіології. Зважаючи на зв'язок з науковими темами і широке висвітлення результатів у вітчизняній та світовій науковій літературі, обговорення на міжнародних форумах, а також перспективність напрямку даних досліджень, вважаю, що дисертація відповідає п.11 «Порядку присудження наукових ступенів» Постанови Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року №567 (зі змінами, внесеними в Постановах КМ № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016), щодо кандидатських дисертацій, а її автор Аліна Юріївна Лучкова заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю – 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

#### Офіційний опонент

доктор біологічних наук, професор  
ННЦ «Інститут біології і медицини»,  
Київський національний університет імені Тараса  
Шевченка,  
професор кафедри фізіології людини і тварин



Янчук Петро Іванович

Підпис проф. Янчука П.І. засвідчую:

Підпис засвідчую  
вчений секретар НАЧ  
КАРАУЛЬНА Н.В.  
05.06.2020р.

