

официального оппонента на диссертацию Ведерникова Александра Андреевича «Сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий печени некоторых видов млекопитающих и птиц» представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - «Биохимия».

Работа Ведерникова Александра Андреевича «Сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий печени некоторых видов млекопитающих и птиц» посвящена мало затронутым аспектам очень популярной в научной литературе и широко исследуемой темы. Достаточно давно в митохондриях высших млекопитающих обнаружен механизм образования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой циклоспорин-чувствительной неспецифической поры, (mitochondrial permeability transition, МРТ), который, как выяснилось благодаря многолетним исследованиям в разных лабораториях, играет важную роль в механизмах клеточной гибели и патологических процессов в организме. Исследования в данной области имеют не только фундаментальное значение, но и дают надежду найти новые способы воздействия на механизмы повреждающего действия активных форм кислорода, гипоксии, воспаления и борьбы с процессами онкогенеза и старения. Однако, так как большинство таких исследований обычно выполняется на традиционных объектах, т.е. на мышах, крысах и культивируемых клетках человека и животных, исследование видовых и эволюционных особенностей этой системы остались малоизученными. Все немногочисленные имеющиеся литературные данные на этот счет приведены автором в литературном обзоре и анализируются при обсуждении собственных результатов.

В принципе, уже было известно, что у низших эукариотических организмов, например, у дрожжей, классическая неспецифическая пора в митохондриях отсутствует, и процесс пермеабиллизации митохондриальной мембраны имеет значительные отличия. Имелись также отдельные подробные исследования процессов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабиллизации внутренней мембраны митохондрий в растениях, у насекомых на примере *Drosophila melanogaster*, а также нескольких видов земноводных и рыб. Эти далеко не исчерпывающие результаты были обобщены в обзоре Люка Азлин (Luca Azzilin) с соавторами, опубликованном в 2010 г. под названием «The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals». Автором данной диссертационной работы восполнен значительный пробел в этом ряду от одноклеточных до млекопитающих животных и

впервые подробно изучены механизмы МРТ (mitochondrial permeability transition) у представителей класса птиц.

Это первое достаточно подробное систематическое исследование неспецифической проницаемости внутренней мембраны в митохондриях у птиц продемонстрировало значительные отличия образования неспецифической поры во внутренней мембране митохондрий печени животных и птиц. Таким образом, представленная работа, очевидно актуальна и перспективна по своим задачам.

Диссертация в целом построена в традиционном стиле, состоит из введения, трех глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение», заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 106 страницах, включая список литературы, собственные экспериментальные результаты проиллюстрированы в 36 рисунках и 7 таблицах. Список цитируемой литературы содержит 205 ссылок.

Введение в целом достаточно четко подводит к истокам проблемы, которой посвящена работа. Правда, немного неестественно звучит на стр.7, попытка связать суть работы со старением и утверждение что виды использованных птиц отбирались по каким-то определенным соображениям. Честнее было бы сказать, что объект в целом был выбран в силу его неисследованности, а конкретные виды - в силу их доступности.

Цели работы сформулированы четко. Научная новизна, актуальность и практическое значение не вызывают сомнений. Основные научные положения, выносимые на защиту, строго аргументированы и подтверждены полученными с помощью адекватных методов собственными результатами научных экспериментов.

Обзор литературы позволяет познакомиться со всеми основными научными данными, необходимыми для анализа результатов работы. Публикаций, посвященных различным аспектам МРТ и роли митохондрий в транспорте и депонировании ионов  $Ca^{2+}$  в клетке настолько катастрофически много, что систематически их изложить в представленных рамках было бы невозможно. Поэтому часть литературного обзора, посвященная этим вопросам, носит ознакомительный характер и не претендует на полноту. Параграфы 1.4. и 1.5., посвященные тканевым и эволюционно-видовым различиям функционирования этих механизмов, более узко привязаны к теме диссертации. На эту тему опубликовано не так много источников и, тем более, обзоров. Поэтому при небольшой доработке и включении собственных, уже опубликованных результатов, эти материалы заслуживают отдельной публикации в виде обзора.

Материалы и методы изложены достаточно полно и позволяют однозначно воспроизвести условия всех экспериментов. Благодаря возможности вникнуть в детали

экспериментов можно следующее замечание: не было ли целесообразным при последней заключительной промывке полученных препаратов митохондрий исключить из состава среды не только BSA, но и полностью убрать ЭГТА? Если учитывать, что среда выделения всегда содержала 1 мМ ЭГТА, препараты митохондрий в эксперименте разводились в 50 раз, а среда инкубации всегда содержала исходно 20 мкМ ЭГТА, то общее содержание ЭГТА в среде инкубации доходило до 40 мкМ ЭГТА. Непонятно, почему необходимо было поддерживать такой уровень хелаторов, и вряд ли можно говорить об объективности величин кальциевой нагрузки, вызывающей тот или иной эффект. Однако, в силу того, что все представленные результаты носят качественный и сравнительный характер, а во всех соответствующих экспериментах условия были одинаковыми, данное замечание не может поставить под сомнение выносимые на защиту автором положения и сделанные выводы.

Первый раздел главы «Результаты и обсуждение» посвящен тщательному исследованию параметров дыхания препаратов митохондрий печени, избранных в качестве объектов животных: крыс, мышей, кроликов, голубей и цесарок двух видов. Получен достаточно парадоксальный результат: митохондрии выделенные из наиболее продуктивной породы цесарок, в отличие от обычных, отличаются резко пониженными параметрами как скорости фосфорилирования АДФ, так и низкой чувствительностью к разобшающему действию пальмитиновой кислоты. Этот результат в диссертации фиксируется, но его обсуждению не уделяется значительного внимания, хотя, тут можно было бы порассуждать на тему стратегии выживания теплокровных животных, биопродуктивности и эффективности обмена веществ. Автор уделяет более значительное внимание доказательству того, что полученные результаты исследований выбранных объектов полностью соответствуют ранее опубликованным в их научном коллективе результатам, см. (Самарцев и др., 2005). Эти результаты свидетельствуют о том, что оптимальным интегральным коэффициентом, характеризующим эффективность окислительного фосфорилирования, может служить коэффициент  $P_c$ , вычисляемый из соотношения скорости синтеза АДФ и скорости дыхания  $V_4$ . Это косвенно свидетельствует о том, что при фосфорилирующем дыхании скорость свободного окисления не ингибируется, и может говорить о возможности непосредственного переноса протона на АДФ-синтазу без освобождения в среду. Хотя данный результат никак не использован в выводах диссертации, это вполне может быть украшением работы, но без ущерба для обсуждения основной темы диссертации, - межвидовых различий МРТ и транспорта кальция в митохондриях.

Во втором 3.2. и третьем разделах 3.3, тремя независимыми методами, а именно оптической регистрацией набухания митохондрий, регистрацией потенциала путем измерения распределения катионов тетрафенилфосфония и, в-третьих, путем регистрации

изменения концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  селективным электродом, показано, что для митохондрий птиц циклоспорин-чувствительная  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая пора требует для индукции значительно более высоких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ , имеет меньшую амплитуду и скорость открывания. Очень интересный результат получен на митохондриях голубей, и свидетельствует о чрезвычайно низкой способности их митохондрий накапливать и удерживать кальций. Можно предположить, что он все же проникает в матрикс, но, видимо, не путем электрогенного унипорта, а путем неэлектрогенного обмена, раз он все же индуцирует неспецифическую циклоспорин-чувствительную пору. Весьма принципиальный результат в последнем разделе свидетельствует о том, что полностью отсутствует какая-либо корреляция между устойчивостью митохондрии к  $\text{Ca}^{2+}$  и скоростью фосфорилирования в препаратах митохондрий как в присутствии, так и в отсутствие циклоспоринона.

В разделах 3.4. и 3.5., соответственно, показано что для митохондрий печени птиц характерна также меньшая чувствительность к прооксиданту, - третбутилгидропероксиду, который является активатором циклоспорин-чувствительной поры и, что для них характерна также меньшая чувствительность к альфа-омега дикарбоновым жирным кислотам, вызывающим образование  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой циклоспорин-нечувствительной поры в митохондриях. Это является самым удивительным, т.к. последний механизм имеет совершенно другую, чисто липидную природу и образование такой поры может быть продемонстрировано на искусственных липосомах. В данной работе высказывается предположение о том, что устойчивость митохондрий печени птиц к активации циклоспорин-зависимой поры под действием  $\text{Ca}^{2+}$  и прооксидантов обусловлена их меньшей способностью транспортировать и накапливать  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако, можно высказать сомнения по этому поводу. Это было бы верно, если бы для сборки липидной поры в присутствии  $\alpha,\omega$ -гексадекандикарбоновой кислоты и ионов  $\text{Ca}^{2+}$  требовался бы транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс митохондрий, но возможность сборки таких пор в искусственных липосомах, не способных транспортировать ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , противоречит этому предположению. Более того, в работах на которые и ссылается автор (Dubinin et al., 2014), большие однослойные липосомы получают в среде, содержащей 50 мкМ ЭГТА, а значит изнутри они не содержали  $\text{Ca}^{2+}$ , следовательно, для сборки поры не нужно присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с внутренней стороны липосом. Впрочем, оспариваемое утверждение не выносится в качестве основного вывода на защиту. Можно предположить, что не особенности транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  определяют пониженную чувствительность митохондрий птиц к  $\alpha,\omega$ -дикарбоновым кислотам, а, например, измененный состав липидов мембран митохондрий. В любом случае, причины положительной связи между способностью к циклоспорин-чувствительной и циклоспорин-нечувствительной пермеабилитации митохондрий, при сравнении этих параметров между

животными и птицами, - остается не объясненными. В заключении автор обобщает все полученные принципиальные результаты работы и формулирует основные выводы. Все они строго обоснованы полученными результатами и не вызывают сомнений. Другой вопрос, что не все они одинаково значимы и, возможно, следовало бы оставить четыре самых принципиальных:

1. Для индукции МРТ поры в митохондриях птиц, по сравнению с митохондриями млекопитающих, требуются более высокие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

2. Для индукции МРТ поры в митохондриях птиц характерна большая устойчивость к индуцирующему действию третбутилгидропероксида.

3. Митохондрии птиц менее чувствительны к действию  $\alpha, \omega$ -дикарбоновых кислот индуцирующих пермабиллизацию митохондрий по циклоспорин-нечувствительному механизму.

4. Для митохондрий печени сизого голубя (*Columba livia*) характерна неспособность к потенциалзависимому унипорту ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Главное замечание по оформлению диссертации - это отсутствие в ней списка опубликованных самим автором работ, как в отдельном виде, так и в составе общего списка цитируемых работ. Список опубликованных работ, как известно, обязательно присутствует в автореферате. То, что в требованиях ВАК забыли указать это требование к диссертации, не является серьезным оправданием. В результате, при прочтении диссертации, для того чтобы ответить на существенный вопрос: опубликованы ли все основные результаты работы в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, при отсутствии под рукой автореферата, - потребуются специальные изыскания.

Во Введении и в Обзоре литературы диссертант иногда грешит ссылками не на первоисточники экспериментальных фактов или идей и даже не на авторские обзоры, а на значительно более поздние работы и относительно новые обзоры. Наверное, с точки зрения молодых исследователей прямая ссылка на работы «середины прошлого века» кажутся анахронизмом. Но, с другой стороны, работы Дэнхема Хармана, автора «Свободнорадикальной теории старения» (Harman D., 1956) и «Митохондриальной свободнорадикальной теории старения» (Harman D., 1972), не только доступны в электронном виде, но есть его относительно свежие научные обзоры вплоть до 2009 г. и умер он ровно два года назад. 25 ноября 2014 г. едва не дожив до 100 лет. Не очень изящно ссылаться на него по работе (Furness L.J and Spekman J.R., 2008).

По сути представленной работы можно высказать только еще одно принципиальное замечание. Вся работа выполнена исключительно на препаратах митохондрий, полученных из одной ткани, - ткани печени животных и птиц. Учитывая, что препараты митохондрий

обычных лабораторных животных демонстрируют сходную природу механизмов МРТ , хотя и отмечаются тканевые отличия, о чем подробно говорит диссертант в параграфе 1.5. , см. в частности работу и ссылки в ней (Brustovetsky N. and Dubinsky J.M., 2000) об особенностях митохондрий мозга, можно предполагать, что выявленные особенности механизма МРТ у птиц являются видо- и эволюционно- специфичными. Очень интересно наблюдалась бы сходная специфика в индукции МРТ, под действием ионов  $Ca^{2+}$  по циклоспорин-чувствительному механизму и нечувствительному механизму в присутствии  $\alpha,\omega$ -жирных кислот, в экспериментах с препаратами митохондрий, выделенных из других тканей (скелетные мышцы, сердце, мозг). Остается надеяться, что это будет предметом дальнейших исследований.

Указанные замечания не отменяют значимости представленной работы. Основные результаты работы отражены в четырех работах в рецензируемых журналах соответствующих требованиям ВАК, одна из них в высоко рейтинговом зарубежном журнале. Материалы диссертации хорошо представлены и апробированы на отечественных и международных конференциях. Автореферат полностью соответствует и хорошо раскрывает содержание диссертации. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. По степени актуальности, объему проделанной работы и приоритету впервые полученных фактов, диссертационная работа Ведерникова А.А. полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - «Биохимия», а автор заслуживает присуждения ему искомой степени.

Старший научный сотрудник  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института  
биофизики клетки Российской  
академии наук к.б.н.  
р.т. 8(4967)73-93-40  
e.mail: [amerkhanov@mail.ru](mailto:amerkhanov@mail.ru)

Амерханов Зариф Гарриевич

Подпись с.н.с. ИБК РАН Амерханова З.Г. подтверждаю:  
Ученый секретарь Федерального  
государственного бюджетного  
учреждения науки Института  
биофизики клетки Российской  
академии наук к.б.н.



Масулис И.С.

31 октября 2016 г.