

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу ВЕДЕРНИКОВА Александра Андреевича «Сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий печени некоторых видов млекопитающих и птиц», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Современное понимание роли митохондрий в жизнедеятельности клетки вышло далеко за пределы знаний об участии этих органелл в обеспечении внутриклеточных процессов энергией АТФ. Согласно новым данным, митохондрии обладают многочисленными системами транспорта ионов, благодаря чему участвуют в поддержании внутриклеточного ионного гомеостаза. Они участвуют в производстве тепла в результате работы разобщающих белков и активации цикла калия в митохондриях. Кроме этого, установлена центральная роль митохондрий в инициации процессов клеточной гибели (апоптоза или некроза). Важную роль в развитии клеточной гибели играет открытие во внутренней мембране митохондрий  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых неселективных пор.

Несмотря на значительный объем представленных в литературе сведений о функционировании митохондрий при различных физиологических и патологических состояниях, в этой области исследований имеется целый ряд нерешенных вопросов. Например, практически полностью отсутствуют данные о функционировании митохондриальных систем транспорта ионов и пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий, выделенных из позвоночных животных, не относящихся к лабораторным животным. Исследования в этом направлении являются перспективными, поскольку позволят понять механизмы эволюции и регуляции внутриклеточных митохондриальных процессов, связанных с видовой специфичностью, характером выполняемых функций различными тканями животным, а также оценить влияние экстремальных факторов окружающей среды на функционирование митохондрий.

Диссертационная работа Ведерникова Александра Андреевича посвящена выяснению механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации митохондрий печени разных видов млекопитающих (мышь, крысы и кролики) и птиц (голуби и цесарки двух пород (серо-крапчатая популяция цесарок (СКП) и загорская белогрудая порода цесарок (ЗБП)). В работе проведено сравнение резистентности митохондрий этих животных к индукторам митохондриальной поры двух типов - циклоспорин А-чувствительной и нечувствительной, и сделана попытка выяснить, что лежит в основе этих различий.

Диссертация построена по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов и их

обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 106 страницах, содержит 36 рисунков и 7 таблиц. В списке процитированной литературы 205 ссылок.

В разделе «Обзор литературы» автор изложил представления о современных научных проблемах в изучаемой области. Рассмотрены вопросы о метаболической активности животных и зависимости от неё продолжительности жизни птиц и млекопитающих. Большое внимание уделено описанию пермеабилзации митохондрий, индуцированной ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Подробно охарактеризованы процессы образования в митохондриях белкового мегаканала - МРТ поры, и липидной поры, индуцированной жирными кислотами и кальцием. Также кратко изложены имеющиеся в литературе данные о пермеабилзации митохондрий различных живых организмов. Большинство работ, которые автор цитирует в обзоре, опубликовано в течение последних лет, что подтверждает актуальность темы исследования, выбранной диссертантом.

В разделе «Материалы и методы исследования» приводится подробное исчерпывающее описание всех использованных автором методов, достаточных для независимого воспроизведения всех проведенных экспериментов. Сами методы исследования современны и отвечают поставленным в работе задачам.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из 5 глав. Главы логически связаны друг с другом и после прочтения становится понятно, что это цельное и законченное исследование.

В первой главе результатов рассмотрены особенности дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени млекопитающих (мышь, крысы и кролики) и птиц (сизый голубь, серо-крапчатая популяция цесарок (СКП) и загорская белогрудая порода цесарок (ЗБП)). Как показано в работе, в ряду мышь-крысы-кролики снижаются показатели скорости дыхания во всех функциональных состояниях и увеличиваются параметры сопряжения (АДФ/О и дыхательный контроль). Митохондрии голубей и серо-крапчатая популяция цесарок не отличаются по показателям дыхания и окислительного фосфорилирования от митохондрий печени крыс. В то же время, загорская белогрудая порода цесарок характеризуются более низкой скоростью дыхания в состоянии 2 и более высокой в состоянии 4, а также наиболее слабым из всех исследованных животных сопряжением дыхания и синтеза АТФ, что связано, вероятно, с её образом жизни.

В следующих трёх главах результатов работы автор описывает пермеабилзацию митохондрий печени различных животных, связанную с открытием циклоспорин А-чувствительной поры, индуцированной высокими концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ . Важным выводом работы является то, что митохондрии печени птиц более резистентны к индукторам МРТ поры ( $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$  или  $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_i$  + третбутилгидропероксид), чем митохондрии

млекопитающих. Показано, что открытие МРТ поры сопровождается митохондриальным набуханием и падением мембранного потенциала. Сделано предположение о том, что резистентность митохондрий птиц (цесарок) связана с их способностью эффективно поглощать и удерживать ионы кальция (кальциевая емкость митохондрий печени цесарок значительно выше, чем млекопитающих). Неожиданным, но очень интересным результатом оказалось то, что митохондрии голубей не могут эффективно поглощать ионы кальция, чем также можно объяснить резистентность митохондрий к МРТ поре. Стоит отметить, что окислительный стресс, вызванный третбутилгидропероксидом, значительно стимулировал открытие МРТ поры в митохондриях всех групп животных (кроме митохондрий голубей).

В последней главе результатов автор исследовал действие дикарбоновой  $\alpha,\omega$ -гексадекандиовой кислоты (ГДК) как индуктора  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой циклоспорин А-нечувствительной поры в митохондриях печени исследуемых животных. Показано, что ГДК и  $\text{Ca}^{2+}$  индуцируют циклоспорин А-нечувствительную пермеабиллизацию как в митохондриях млекопитающих, так и в митохондриях печени птиц. В то же время, как и в случае с открытием МРТ поры, митохондрии птиц более резистентны к ГДК и  $\text{Ca}^{2+}$ , чем митохондрии млекопитающих. Наибольшей резистентностью обладают митохондрии печени голубей. В обсуждении результатов автор попытался проанализировать, какие механизмы могут лежать в основе резистентности птиц к индукторам двух исследуемых типов пор. Для интерпретации полученных результатов были приведены данные, уже описанные в литературе по этим вопросам.

В разделе «Заключение» еще раз достаточно подробно обсуждаются данные, которые впервые полученные в данной работе. Представленные выводы оригинальны, обоснованы и соответствуют полученным результатам.

В целом, проделанная работа, несомненно, заслуживает положительной оценки. В то же время, хотелось бы остановиться на некоторых моментах, которые вызывают вопросы и замечания.

1. Известно, что резистентность к открытию обеих митохондриальных пор, может зависеть от состояния сопряжения органелл, а также от активности системы входа кальция в митохондрии. Что касается степени сопряженности митохондрий, то автор убедительно доказал отсутствие связи между резистентностью и особенностями окислительного синтеза АТФ. Здесь хотелось бы только заметить, что в этих экспериментах желательно было бы рассчитать не только АДФ\О показатель, но и время фосфорилирования АДФ.

2. Автор не уделил достаточного внимания вопросу зависимости резистентности к открытию пор от активности системы входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии. В

работе следовало бы сравнить у разных животных скорость активации дыхания и время входа  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии при добавлении к ним одного и того же количества этого иона. Мне кажется, что этот показатель мог бы иметь прямую корреляцию с резистентностью митохондрий животного к открытию пор.

3. В работе изучена пермеабилзация митохондрий различных животных, индуцированная гексадекандиовой кислотой и  $\text{Ca}^{2+}$ . Выбор именно этой кислоты не вполне понятен, так как она встречается в организме в следовых количествах. В то же время, с физиологической точки зрения было бы интересно изучить, как происходит открытие липидной циклоспорин А-нечувствительной  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой поры, индуцированной пальмитиновой кислотой, которая является наиболее распространённой свободной жирной кислотой в клетке.

Несмотря на высказанные замечания, диссертационная работа А.А. Ведерникова заслуживает высокой положительной оценки. Предложенные вопросы вызваны, прежде всего, интересом к представленным материалам и предложенным объяснениям и только показывают, что работа может иметь многообещающее продолжение.

Таким образом, следует признать, что диссертационная работа Ведерникова А.А., вне всякого сомнения, выполнена на актуальную тему на современном методическом уровне, содержит новые серьезные научные результаты, имеющие важное значение для развития современной биохимии, биофизики и мембранологии. Содержание автореферата и опубликованных статей полностью отражает содержание диссертации. Считаю, что диссертационная работа Александра Андреевича Ведерникова на тему «Сравнительное исследование механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой пермеабилзации внутренней мембраны митохондрий печени некоторых видов млекопитающих и птиц» удовлетворяет всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Заслуженный деятель науки РФ,  
зав. лабораторией митохондриального транспорта  
ИТЭБ РАН, д.б.н., профессор

Миронова Галина Дмитриевна

Адрес: 142290, Московская обл., г. Пушкино, Институтская 3, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН)  
Телефон: (4967)73-94-76, Факс: (4967)33-05-53  
Сайт: web.iteb.psn.ru  
e-mail: mironova40@mail.ru



УДОСТОВЕРЯЮ - Зав. Канц.  
Е. П. ГРУЗДЕВА