

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Шкриля В'ячеслава Михайловича

«Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах», представлену до захисту в спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність обраної теми

Внутрішньоклітинний кальцій є одним з найбільш універсальних вторинних месенджерів, що бере участь у передачі сигналу від плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних структур. Ріанодинові рецептори (RyRs) відіграють ключову роль у регуляції кальцієвої динаміки, яка є важливою для збудження та функціонування клітин. Відкриття цих каналів у відповідь на сигнали збудження призводить до посилення кальцієвого сигналу, що своєю чергою регулює активність м'язів, нервову передачу сигналів та інші важливі клітинні функції. Треба визнати, що незважаючи на багато публікацій стосовно функціонування та активності RyRs та їх впливу на кальцієвий гомеостаз, існує багато невизначених аспектів. Наприклад, ряд захворювань, таких як раптова серцева смерть, м'язова дистрофія Дюшена, неврологічні та інші захворювання, пов'язані з порушеннями саме кальцієвого гомеостазу, проте механізми виникнення цих порушення достовірно не з'ясовані. Значний внесок у встановлення цього мають, насамперед, RyRs. Глибоке розуміння механізмів регуляції або підсилення кальцієвого сигналу у збудливих клітинах відкриває можливості для корекції внутрішньоклітинного функціонування у разі порушення. Тому дана робота, що присвячена вивченню ріанодин рецептор опосередкованій регуляції кальцієвого сигналу є своєчасною і актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідної тематики відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та інших програм, що виконуються відділом (номери державної реєстрації 0118U007344, 0116U004470 та 0120U001281). Частина роботи була виконана в рамках програм міжнародного співробітництва "Клітинні системи в нормі на патології" в Університеті Медицини та Стоматології Нью-Джерсі, США та Медичному Центрі Університету Раш, Чикаго, США.

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

Ступінь надійного одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень і висновків, сформульованих у роботі, є досить високим. Складові, що гарантують цей високий рівень:

- Дисертант правильно використовував сучасні експериментальні методи, які відповідали меті та завданням дослідження. В процесі виконання роботи були використані такі сучасні методичні підходи: багатовимірна скануюча конфокальна мікроскопія, епіфлюоресцентна мікроскопія, електрофізіологічні методи дослідження, флешфотоліз буферизованого кальцію, культивування та штучне виділення клітин, моделювання та прогумування, комп'ютерна обробка даних та статистична обробка числових результатів. Крім того, було запропоновано декілька нових експериментальних підходів для визначення та змін концентрації кальцію в клітині.
- Експериментальна частина роботи містить сукупність змістовного фактичного матеріалу, який органічно пов'язаний з метою та завданнями дисертації. Власні експериментальні результати дисертанта Шкриля В.М. чітко відображені та аргументовані.
- Висновки дисертаційної роботи повністю відображають отримані дослідником фактичні результати, їх обґрунтованість базується на адекватних методах дослідження, достатньому обсязі та статистичному опрацюванні результатів.
- Матеріал дисертації пройшов надійну попередню апробацію на авторитетних наукових конференціях, симпозіумах та семінарах. Крім того, експериментальні результати були опубліковані в авторитетних фахових наукових журналах, що підкреслює їхню важливість та актуальність в науковому співтоваристві. При цьому 10 із 17 статей мають перше авторство та 5 виконані одноосібно дисертантом.
- Високий фаховий і науковий потенціал, притаманний дисертантові. Виконання докторської дисертації такого рівня вимагала від автора не лише ґрунтованої теоретичної та методичної підготовки у галузі біофізики, що є очікуваним відповідно до мети роботи, але також значного рівня знань у фізіології, біохімії, клітинній біології, а також високої компетентності у математиці та комп'ютерному моделюванні.

Теоретичне і практичне значення роботи

Теоретичне значення роботи полягає в тому, що вона містить ряд відкриттів (нових даних), що розширюють сучасні фундаментальні уявлення про кальцієвий гомеостаз збудливих клітин. Ці нові знання можна використати у курсах викладання біофізики і нормальної фізіології у закладах вищої освіти біологічного і медичного профілю. Зокрема:

- Отримані дані демонструють, що у кардіоміоцитах передсердь чергування від стимул до стимулу залежних від часу властивостей реституції та рефрактерної кінетики механізму вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму є ключовим механізмом, що лежить в основі серцевих альтернацій.
- Отримано додаткову інформацію про участь RyRs третього типу у внутрішньоклітинній динаміці Ca^{2+} сигналів, індукованих деполяризацією або електричною стимуляцією, з подальшою зміною концентрації Ca^{2+} в різних ділянках пірамідних нейронів гіпокампу.
- Дослідження показали суперечливі результати стосовно кальцій індукованого вивільнення у скелетних м'язах. Виявлено, що у скелетних м'язових клітинах жаби спостерігаються реакції, пов'язані з кальцієво-індукованим вивільненням кальцію (CICR). Проте, у волокнах скелетних м'язів миші канали RyRs другого типу не реагують на стимуляцію кальцієм аж до 8 мкМ. Це свідчить про відсутність CICR у нормальному процесі збудження-скорочення у скелетних м'язах ссавців.
- Отримано результати які свідчать про те, що субпопуляція мітохондрій знаходиться в тісній функціональній і, ймовірно, структурній близькості до СР, що призводить до утворення субклітинних мікродоменів, в яких Ca^{2+} має переважний доступ до мітохондрій.

Практичне значення роботи полягає у тому, що дисертаційна робота не лише поглиблює розуміння фундаментальних принципів внутрішньоклітинної Ca^{2+} сигналізації, але формує уявлення про молекулярну основу різних захворювань, пов'язаних з дисфункцією RyRs, що може слугувати для розробки терапевтичних стратегій лікування різних захворювань таких як раптова серцева смерть, м'язова дистрофія Душена, неврологічні та інші.

Вперше запропоновано методичні підходи дослідження Ca^{2+} спалахів у місці вивільнення з СР, ґрунтовані на тривимірному конфокальному скануванні флуоресценції, що може бути використаним для дослідження RyRs в подальших дослідженнях. Запропонований новий метод просторової, складної, дифракційно-обмеженої фотоактивації та фотознебарвлення в живих клітинах, може бути використано для вивчення структурних і функціональних деталей кальцієвої сигналізації. Дисертантом адаптована та модифікована формула Грінкевича для визначення вмісту вільного кальцію в клітині при двох хвильовому методі збудження флуоресцентного барвника при використанні ПЗЗ камери. Цю модифікацію необхідно використовувати в подальших дослідженнях.

Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій, сформованих у дисертації

Завдяки використанню сучасних методичних підходів, в кардіоміцитах, як типових електрозбудливих клітинах, що здатні до скорочення, показана важлива

роль р'янодинових рецепторів на прикладі достовірної реєстрації кальцієвих спалахів та локальних сигналів від центрів вивільнення кальцію у процесі перетворення скорочення в збудження. Показано, що динаміку збільшення Ca^{2+} , який входить у клітину та Ca^{2+} -індукованого вивільнення кальцію можливо достовірно розділити на рівні окремих центрів вивільнення кальцію як у клітинах передсердя, так і у шлуночків міокарда, як у часі, так і просторі. Вперше було вивчено властивості Ca^{2+} спалахів, що зареєстровані у місці вивільнення кальцію від групи 20 до 30 відкритих каналів RyRs, встановлено, що розподіл амплітуди таких подій мав одномодальний характер. Розкриті нові аспекти регуляції мітохондріального окислювального-відновлювального стану щодо регуляції вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного кальцієвого депо на прикладі активності групи RyRs в скелетних м'язах. В дистрофічних волокнах скелетних м'язів під впливом осмотичного стресу, розбалансованість в АФК сигналах призводить до того, що Ca^{2+} спалахи з'являлися не тільки на периферії клітини, а також поширювалися в центр клітини. Збільшення мітохондріального кальцію та посилення утворення мітохондріального АФК в mdx волокнах підсилює аномальні Ca^{2+} сигнали. Виявлено, що в пірамідальних нейронах гіпокампу шурів зростання концентрації вільного Ca^{2+} є асинхронним і затримується в центральній ділянці порівняно з примембранними ділянками. Короткочасна електрична стимуляція недостатня для того, щоб викликати вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму через кальцій-індуковане вивільнення кальцію. Натомість, для активації RyRs третього типу та вивільнення Ca^{2+} необхідна тривала стимуляція.

Повнота викладу наукових положень, сформульованих в опублікованих працях та у дисертації

Результати дисертаційної роботи були опубліковані у 17 статтях міжнародних журналів, 12 з яких у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, одному розділі монографії, а також зафіксовані патентом на корисну модель та у 27 тезах міжнародних конференціях і з'їздах. Публікації повністю відображають зміст дисертації. Крім того, матеріали дисертаційної роботи були представлені автором на міжнародних конгресах і конференціях.

Структура і зміст реферату дисертації ідентичні основним положенням і повністю відображають основні результати проведеного дослідження.

Дискусійні положення та зауваження щодо дисертації

Оскільки дисертація складається із сукупності наукових опублікованих робіт, які були належним чином рецензовані та викладені у авторитетним виданнях, до текстової частини зауважень нема. У процесі ознайомлення із

дисертаційною роботою виникла низка зауважень і запитання, які пропонуються для дискусії:

1. Дискусійним є твердження щодо регуляторної ролі мітохондрій стосовно RyRs завдяки АФК. Загальновідомо, що мітохондрії здатні захоплювати кальцій при його зростанні у цитозолі та є основним джерелом генерації АФК, де вони безперервно генеруються під час окисного фосфорилування та. Який механізм регуляції RyRs за участю АФК за фізіологічних умов та при патології?
2. У більшій частині цього дослідження кальцієві спалахи використовувалися як інструмент для вивчення активності RyRs. Застосування багатовимірної скануючої конфокальної мікроскопії для дослідження спалахів, думку опонента, ускладнює отримання відповідних характеристик активності RyRs. Постає наступне дискусійне питання: чи використовувалися раніше Ca^{2+} спалахи як інструмент для вивчення активності RyRs або фармакологічної дії деяких речовин на ці рецептори? Якщо так, то які труднощі виникали і що було покращено?
3. Вибір нейронів для даних досліджень, на думку опонента, виходить за логічні міркування. Мету дослідження можливо було виконати тільки на м'язах, додавши для порівняння гладенькі м'язи. У порівняльному аспекті доречно було б обрати, наприклад, інші рухливі клітини – сперматозоїди.
4. Дисертаційна робота Шкриля В.М. є достатньо різноплановою з використанням як різних експериментальних моделей і проведеною на різних дослідних об'єктах (тканини ссавців і холоднокровних; скелетні м'язи, кардіоміоцити, нейрони). Доречно було б при формулюванні висновків, зробити порівняння особливостей кальцієвої сигналізації у різних об'єктах.
5. У статтях опублікованих дисертантом зазначено, що оцінку статистичної достовірності проводили за *t*-критерієм Стьюдента. Чи перевірялись дані щодо нормальності розподілу?
6. У дисертації не наведено на якій кількості тварин проведено дослідження, не зазначено номер і дату протоколу комісії з біоетики.
7. Робота містить незначну кількість граматичних та стилістичних помилок, наприклад “порочне коло”, “виробництво АТФ”, “поверхнева мембрана” та ін.

Представлені зауваження та запитання носять здебільшого дискусійний характер, не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи та не зменшують її наукової цінності.

ВИСНОВОК

Докторська дисертація Шкриля В'ячеслава Михайловича на тему «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах» виконана у вигляді наукової доповіді. Докторант Шкриль В.М. представив роботу

12 статтями у виданнях, віднесених до першого і другого кватилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, що відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України №1220 від 23.09.2019 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук» (із змінами, внесеними згідно з наказами Міністерства освіти і науки № 496 від 27.05.2022, № 285 від 08.03.2024). За актуальністю, ступенем новизни, науковим рівнем та практичною цінністю, змістом та оформленням відповідає вимогам, передбаченим пунктами 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук» (Постанова Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197 із змінами, внесеними згідно з Постановами Кабінету Міністрів України № 502 від 19.05.2023, № 507 від 03.05.2024) та наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12.01.2017 р. «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

Дисертаційна робота Шкриль В.М. є завершеним науковим дослідженням, що вносить істотний вклад у розуміння кальцієвої регуляції в збудливих клітинах за рахунок вкладу ріанодинових рецепторів. За своєю актуальністю, сучасним методичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною і вірогідністю одержаних експериментальних даних, обґрунтованістю висновків і науковою важливістю для сучасної біофізики, фізіології дисертація в цілому відповідає вимогам, що ставляться до докторських дисертацій, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент –
завідувач кафедри біофізики
Львівського національного медичного університету
імені Данила Галицького МОЗ України,
доктор біологічних наук, професор

Фафула Р.В.

29.05.2024 р.

