

Голові разової спеціалізованої вченої ради ID 6326
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України
доктору біологічних наук, професору,
заступнику директора з наукової роботи,
завідувачу відділу біофізики іонних каналів
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця
НАН України
Лук'янець Олені Олександрівні

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу

Меженського Олега Руслановича

«Вивчення ролі PPAR- γ в регуляції ендотелійзалежних реакцій аорти щура в нормі та при діабеті 2 типу»

подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

За даними ВООЗ поширеність захворювання на діабет продовжує зростати, при чому це відбувається швидше у країнах з низьким і середнім рівнем доходу, до яких відноситься і Україна, ніж у країнах з високим доходом. У 2019 році діабет спричинив в усьому світі приблизно 2 мільйони смертей. Серед ускладнень діабету, які спричиняють таку значну смертність і інвалідизацію населення, головну роль відіграють серцево-судинні захворювання, такі як гіпертензія і атеросклероз.

У дослідженні Меженського О.Р. головна увага була приділена вивченню ролі PPAR- γ а в регуляції ендотелій-залежного розслаблення аорти щура в нормі та

при діабеті 2 типу. Така постановка проблеми є обґрунтованою і доцільною, а її актуальність у контексті спричиненої найбільш поширеним діабетом 2 типу дисфункції судин є безперечно високою.

Не менш актуальним і практично важливим є дослідження впливу агоністу PPAR- γ рецепторів росіглітазону на скоротливу активність судин у нормі та при діабеті. Росіглітазон - це синтетичний препарат класу тiazолідинедіонів, що через активацію PPAR- γ рецепторів модулює транскрипцію ряду генів, позитивним наслідком чого є підвищення чутливості до інсуліну периферичних тканин. Цей препарат призначався для лікування діабету 2 типу після отримання дозволу FDA у 1999 році, але зважаючи на значні побічні ефекти останнім часом застосування цього препарату є досить обмеженим лише у випадках, коли інші антидіабетичні засоби не є достатньо ефективними, а у деяких країнах він навіть заборонений. Таким чином, дані щодо цілого спектру потенційних молекулярних мішеней для дії цього препарату, а також стосовно його ефектів на тонус аорти у нормі та при діабеті 2 типу, які були отримані у цій роботі, є надзвичайно актуальними і цінними для фармацевтичної промисловості і лікарської практики.

Про актуальність цих досліджень і їх відповідність світовим трендам сучасних біомедичних досліджень свідчить і те, що за даними PubMed кількість публікацій стосовно впливу цукрового діабету на дисфункцію ендотеліальних і гладеньком'язових клітин судин зростає експоненційним чином і зараз нараховує понад 33 тис. наукових статей. При цьому відмічається значна розбіжність у даних і залишається багато нез'ясованих до кінця питань. Виявлені у даному дисертаційному дослідженні відміни в експресії декількох ключових для ендотелій-залежних реакцій генів, а також функціональні відмінності у регуляції тонусу різних сегментів аорти значною мірою можуть пояснити такі розбіжності, що також є актуальним у цій галузі досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість

У роботі було проведене комплексне, систематичне дослідження кількісних внесків різних відомих молекулярних і фізіологічних компонентів ацетихолін-індукованого (тобто ендотелій-залежного) розслаблення аорти щура у нормі та при експериментальному діабеті 2 типу, а також при дії антидіабетичного засобу росіглітазону.

До найбільш вагомих результатів, які мають наукову новизну, слід віднести наступні:

- шляхом біоінформатичного аналізу виявлені різниці у транскриптомі між проксимальною та дистальною частиною грудної аорти, що корелює з функціональними відмінностями у ацетилхолін-індукованому, тобто ендотелій-залежному, розслабленні у цих частинах аорти;
- кількісно охарактеризовано внесок міоендотеліальних контактів та калієвих каналів вхідного випрямлення (KIR) каналів у якості ендотелій-залежних факторів гіперполяризації мембрани міоцитів аорти (EDHF);
- визначена роль Ca^{2+} -активованих калієвих каналів малої та середньої провідності у розслаблення аорти при активації механо-, осмо- і термочутливого TRPV4 каналу, при цьому варто підкреслити, що в аналогічних дослідженнях до сих пір основна увага приділялась сигнальному комплексу TRPV4 - ріанодинові рецептори внутрішньоклітинних кальцієвих депо - Ca^{2+} -активовані калієві канали великої провідності (BK_{Ca} канали);
- показано, що ефект росіглітазону на тонус аорти у нормі та при діабеті 2 типу опосередкований впливом на NO, ЦОГ та TRPV4 канали, але не на EDHF компонент ендотелій-залежного розслаблення судин;
- крім того, експериментально визначено що росіглітазон впливає на активність гуанілатциклази, а методами молекулярного докінгу показано

можливість взаємодії росіглітазону у мікромолярних концентраціях з гуанілатциклазою та двопородоменими калієвими каналами TWIK та TRAAK, активність яких є важливою для регуляції потенціалу спокою клітин.

З точки зору практичної значимості результати дослідження Меженського О.Р. можуть привернути увагу наукової спільноти, практикуючих лікарів, працівників системи охорони здоров'я щодо застосування росіглітазону для лікування діабету 2 типу. Як зазначено вище, цей антидіабетичний засіб є забороненим у деяких країнах, але отримані результати свідчать про його загалом позитивний ефект щодо нормалізації порушення ендотелій-залежного розслаблення судин при діабеті 2 типу. Отримані здобувачем результати можуть стати основою для розробки нових стратегій використання росіглітазону або розробки і оптимізації препаратів подібної будови. У цьому контексті на особливу увагу заслуговують наведені у роботі дані молекулярного докінгу, що свідчать про можливість взаємодії росіглітазону з двопородоменими калієвими каналами TWIK і TRAAK, а також TRPV4 каналами і розчинною гуанілатциклазою. Ці результати заслуговують на подальшу експериментальну верифікацію.

Результати дослідження також можна рекомендувати для використання при викладанні біологічних дисциплін у закладах вищої освіти.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Для досягнення поставленої мети дисертаційного дослідження Меженський О.Р. використав цілий комплекс комплементарних методів – це біоінформатичні методи аналізу диференційної експресії генів, методи молекулярного докінгу, тензометричні реєстрації скоротливої активності судин в ізометричному режимі, методи статистичного аналізу. Цей комплекс методів є цілком адекватним завданням дослідження.

Отримані результати були адекватно проаналізовані з використанням відповідних статистичних тестів для двох і більше вибірок. Привертає увагу, що дизайн експериментального дослідження базувався на аналізі статистичної потужності (power analysis) - це розрахунок, який використовується для оцінки найменшого розміру вибірки, необхідного для експерименту з урахуванням необхідного рівня значущості, статистичної потужності та розміру ефекту. Такі оцінки є важливими, але вони не так часто робляться у дисертаційних роботах, і це свідчить про ретельний науковий підхід до планування експериментів Меженським О.Р.

Результати дослідження пройшли належну апробацію шляхом їх представлення на 5 наукових конференціях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в рамках наукових програм відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України «Іонні канали – рецептори фізико-хімічних впливів у регуляції збудження-скорочення вісцеральних м'язів у нормі та патології» (номер державної реєстрації 0118U007351) та «Іонні канали як мішені фармакологічного впливу» (номер державної реєстрації 0124U001683).

Структура, обсяг, зміст та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Обсяг дисертаційної роботи складає 160 сторінок, до яких входять всі необхідні розділи викладені в логічному та послідовному порядку, а саме анотація, вступ, огляд літератури, опис використаних матеріалів і методів дослідження, результати і їх обговорення, висновки. Список використаної літератури включає 256 джерел. Загалом у всіх експериментах було використано 93 щура, а отримані результати проілюстровано 46 рисунками та 4 таблицями, що свідчить про велику

кількість проведених досліджень. Серед різних розділів дисертаційної роботи хотілось би зокрема відмітити ґрунтовні розділ 2.4 «Роль PPAR- γ рецепторів у регуляції тону́су судинної стінки» в огляді літератури і розділи 3.4 «Біоінформатичний аналіз даних РНК секвенування» та 3.5 «Метод молекулярного докінґу». Все це дає повне і дуже позитивне уявлення про високу якість проведених досліджень, ретельний аналіз отриманих результатів і їх адекватне узагальнення, на чому базуються висновки роботи. Таким чином, висновки дослідження є обґрунтованими.

Основні положення дисертації висвітлено у 7 наукових працях, серед них 2 статті у фахових періодичних виданнях, які входять до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, і одна з яких з них відноситься до квартилю Q2. Результати дисертаційної роботи були представлені на 5 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження, а саме:

1. В анотації роботи серед використаних методів зазначено РНК секвенування, але це не зовсім точно, адже були використані вже опубліковані дані РНК секвенування. Натомість у цій частині варто було навести весь комплекс методів біоінформатичного аналізу цих даних та зазначити відповідні програми, які були використані у цьому дослідженні.
2. Аналіз транскриптомів грудного і черевного відділу аорта показав збільшену експресію *Cacnald* у черевній аорті. Цей ген кодує альфа-1 субодиницю нейроендокринного кальцієвого каналу L-типу $Ca_v1.3$. Чому тоді у подальших експериментах досліджували роль кальцієвого каналу L-типу $Ca_v1.2$, альфа-1 субодиниця якого кодується геном *Cacnalc*? Ймовірно, що саме цим протиріччям пояснюється те, що у подальших експериментах не були виявлені суттєві відміни у величині ацетилхолін-індукованого

розслаблення у проксимальних сегментах аорта на фоні дії блокатора кальцієвого каналу L-типу нікардипіну (Рис. 4.1.4А).

3. Не зрозуміло, чому у розділі 2.2 «Регуляція тонуусу судинної стінки аорти» зовсім не згадується ендотелій-залежні фактори розслаблення (endothelium-derived relaxing factors, EDRFs), хоча значна увага приділена NO-залежним механізмам, які опосередковані найбільш важливим з EDRFs – NO.
4. Розділ 3.2 «Тензометрія»: склад розчинів варто наводити повністю, наприклад 120 мілімоль/л NaCl, а не 120 мілімоль/л Na⁺.
5. Назва Табл. 3.5.2 потребує уточнення, адже список молекулярних мішеней містить не тільки іонні канали, але також рецептори і ензими.
6. В роботі трапляються неточності термінологічного характеру, наприклад «інозитол-3-фосфат» - правильна повна назва цієї молекули інозитол-1,4,5-трисфосфат, «вазодилатація ГМК» - процес вазодилатації стосується функціонального стану цілої судини, а на рівні окремих міоцитів більш правильним терміном є розслаблення клітини.
7. Відомо, що атеросклероз є одним з найбільш поширених ускладнень діабету, і було показано, що при атеросклерозі значно збільшується експресія PPAR- γ (Sueyoshi et al., 2010 <https://doi.org/10.1016/j.prrp.2010.01.010>). Тому виникає питання чи не можна, хоча б гіпотетично, передбачати доведену у цьому дослідженні роль PPAR- γ у дисфункції ендотеліальних клітин у розвитку атеросклеротичного ураження судин при діабеті.
8. Розділ 5 «Обговорення результатів», зокрема підрозділ 5.3 «Внески компонентів ацетилхолінового розслаблення при діабеті 2 типу та ефект росіглітазону на них»: росіглітазон – це проблемний лікарський препарат, який має багато побічних ефектів і зокрема може спричинити серцеву недостатність і інфаркт міокарду. Тим не менше, як показано у роботі, при діабеті 2 типу зменшується ендотелій-залежне розслаблення аорти, тоді як росіглітазон покращує NO- та ЦОГ-залежні компоненти розслаблення аорти.

Тому виникає питання чи можна стверджувати, що принаймні з точки зору корекції дисфункції ендотелій-залежного розслаблення судин при діабеті 2 типу росіглітазон є корисним лікарським препаратом? На користь цього припущення варто зазначити, що росіглітазон також нормалізує тиск крові через взаємодію з ренін-ангіотензиною системою в експериментальній моделі гіпертензії (Sánchez-Aguilar et al., PPAR Res 2019 doi: 10.1155/2019/1371758).

9. Це дослідження є комплексним і різноплановим, при виконанні якого було отримано багато кількісних даних. При обговоренні результатів варто було б узагальнити ці дані у вигляді діаграми чи схеми, яка б наочно ілюструвала кількісний внесок різних компонентів ендотелій-залежних реакцій у різних відділах аорти у нормі, при діабеті 2 типу та при дії росіглітазону.

10. Відомо, що у регуляції скоротливої активності судин відіграють важливу роль як ендотеліальні TRPV4 канали (наприклад Chen & Sonkusare, Curr Top Membr 2020 doi: 10.1016/bs.ctm.2020.01.007), так і TRPV4 експресовані у мембрані міоцитів (Earley et al., Am J Physiol 2009 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00241.2009>). Чи можна на основі отриманих результатів (наприклад порівняння інтактних і деендотелізованих судин) виокремити роль TRPV4 ендотеліальних і гладеньком'язових клітин?

Висловлені зауваження і запитання носять дискусійний характер, вони не впливають на загально позитивну оцінку роботи.

Висновок офіційного опонента

Дисертаційна робота Меженського Олега Руслановича «Вивчення ролі PPAR-gamma в регуляції ендотелійзалежних реакцій аорти щура в нормі та при діабеті 2 типу» є самостійно проведеним, оригінальним і завершеним дослідженням, яке спрямовано на вирішення актуальної наукової проблеми і яке містить нові, науково

обґрунтовані дані, положення і висновки, що мають теоретичну і практичну цінність.

У підсумку вважаю, що представлена Меженським Олегом Руслановичем дисертаційна робота на тему «Вивчення ролі PPAR-gamma в регуляції ендотелійзалежних реакцій аорти щура в нормі та при діабеті 2 типу» відповідає усім вимогам Постанови Кабінету міністрів України №44 від 12 січня 2022 року «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», вимогам щодо опублікування результатів дисертаційного дослідження на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук відповідно до Наказу Міністерства освіти і науки України №1220 від 23 вересня 2019 року ((із змінами, внесеними згідно з Наказами Міністерства освіти і науки №496 від 27 травня 2022 року і №285 від 8 березня 2024 року), а також вимогам Наказу Міністерства освіти і науки України №40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки №759 від 31 травня 2019 року) щодо оформлення дисертації, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».



Офіційний опонент
завідувач кафедри біофізики та нейробіології
Навчально-наукового центру «Інститут біології та
медицини» Київського національного
університету імені Тараса Шевченка
доктор біологічних наук, професор
Олександр ЖОЛОС

