

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Шаропова Біжана Рашидовича

“Експресія та функція капсаїцинового рецептора TRPV1 у сечовому міхурі щура в нормі та при патології”

представлену на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність проведених досліджень

Дисертаційна робота Шаропова Б.Р. присвячена дослідженню ролі рецептора тепла і капсаїцину TRPV1 у функції та дисфункції сечового міхура щурів. Вона включає цілий спектр питань – від експресії гена, що кодує цей канал-формульний білок, через дослідження його клітинної локалізації та біофізичних властивостей TRPV1-опосередкованих струмів, і до визначення ролі TRPV1 у скоротливій функції детрузора та її порушенні на моделі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету у щурів. Загалом такий план досліджень відповідає найсучаснішим трендам у галузі біомедичних досліджень, а саме – від молекули до функції і розуміння природи її розладів.

Для визначення актуальності даного дослідження потрібно насамперед зупинитися на ролі TRPV1 в організмі людини і тварин. Цей канал був клонований у 1997 р. з нейронів дорсально-корінцевих гангліїв (ДКГ), які також досліджувались і у роботі Шаропова Б.Р., в якості фармакологічної мішені для дії капсаїцину та його похідного резініфератоксину (Caterina et al., 1997). TRPV1 відразу привернув дуже значну увагу дослідників, оскільки вже у цій першій роботі він був позиційований в якості ключової сигнальної молекули у ноцицепції. З часом були отримані докази того, що цей канал з вираженою

полімодальною регуляцією крім сенсорних нейронів широко експресований не тільки в нейронах різних відділів нервової системи, а також і у судинах і різних вісцеральних органах, де він залучений у ряді ключових функцій. Відповідно, як ми це нещодавно розглянули у нашій оглядовій статті, дисфункції TRPV1 різного генезу (порушення експресії, сенситизація та ін.) спричиняє цілий спектр різних захворювань (Storozhuk, Moroz, Zholos, 2019). В дисертаційній роботі досліджувались питання експресії TRPV1 в уротелії, гладеньких м'язах сечового міхура та у специфічній субпопуляції нейронів ДКГ, що іннервують сечовий міхур, а також деякі фундаментальні аспекти активації TRPV1 при дії оксиду азоту – однієї з ключових сигнальних молекул в організмі. Це безперечно актуальні напрямки сучасних біомедичних досліджень.

Іншим не менш актуальним аспектом роботи, якому присвячена значна її частина, є визначення ролі TRPV1 у діабетичній дисфункції сечового міхура. Дійсно, розповсюдженість захворюваності на цукровий діабет у всьому світі зараз набуває масштабів епідемії, і тому важливим є дослідження молекулярних, біофізичних та біохімічних механізмів, що лежать в основі порушення функції різних типів клітин при діабеті. Найбільш значна частина досліджень у цій галузі присвячена ролі TRPV1 в патогенезі діабетичної нейропатії, де вже досягнуто певного консенсусу щодо дисфункції TRPV1 як ключової первинної ланки цих ускладнень діабету. У той же час цілком ймовірно, що TRPV1 може відігравати аналогічну роль і у діабетичній дисфункції сечового міхура, але експериментальні докази цього на сьогодні лише накопичуються, і ці питання поки що залишаються предметом дискусій.

Важливо також зазначити, що існуючі терапевтичні підходи до лікування дисфункції сечового міхура є малоефективними, а ті препарати, які для цього використовуються (зокрема це антагоністи мускаринових рецепторів) характеризуються значними побічними ефектами. Саме це і

визначає актуальність пошуку нових, альтернативних молекулярних мішеней для лікування порушень функції сечового міхура, чому і була присвячена значна частина дисертаційного дослідження Шаропова Б.Р.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

В процесі виконання дисертаційного дослідження автор отримав цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють існуючі уявлення щодо експресії та функції рецептора тепла і капсаїцину TRPV1 у різних клітинних структурах сечового міхура – гладеньком'язових, епітеліальних та нервових закінченнях. Зокрема ним були продемонстровані:

- функціональна експресія TRPV1 у гладеньком'язових клітинах сечового міхура і показано, що TRPV1 ймовірно локалізується у мембрані саркоплазматичного ретикулуму та бере участь у процесах вивільнення іонів Ca^{2+} із внутрішньоклітинних депо – слід особливо підкреслити, що для цього та інших представників супер-родини універсальних клітинних сенсорів TRP накопичується все більше доказів їх локалізації та функціонування крім плазматичної мембрани також і у різних внутрішньоклітинних органелах, таких як ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії, лізосоми та інші;
- можлива участь TRPV1 у процесах холінергічного збудження і скорочення детрузора (хоча механізми передачі сигналу залишаються невідомими і поки що можуть лише обговорюватися у контексті досліджень інших авторів);
- роль сульфгідрил-вмісних реагентів в активації TRPV1 при дії оксиду азоту – важливої сигнальної молекули у міжклітинних комунікаціях;
- відсутність значної експресії TRPV1 в уротелії;

- підтверджена роль TRPV1 у нейронах ДКГ, а саме у їх субпопуляції, що іннервує сечовий міхур.

Практичне значення отриманих результатів, як вже зазначалось вище, у найбільшій мірі стосується проблематики ускладнень цукрового діабету. У цій галузі досліджень автором вперше були проаналізовані диференційні зміни рівня експресії та їх функціональні наслідки у нейронах ДКГ та гладеньком'язових клітинах сечового міхура. У першому випадку спостерігалось посилення функціональної експресії TRPV1 (що також характерно для діабетичної нейропатії та хронічного болу), тоді як у другому випадку при діабеті порівняно з контролем спостерігалось зниження амплітуди скорочень при дії агоніста TRPV1 капсаїцина.

До практичної цінності дисертаційної роботи можна також віднести встановлення модуляції NO-залежної регуляції активності TRPV1 каналів при дії сульфгідрил-вмісних реагентів, що має загально-біологічне значення.

Таким чином, отримані результати мають як фундаментальне, так і прикладне значення. Вони суттєво розвивають та доповнюють сучасні уявлення про роль рецептора тепла і капсаїцина TRPV1 крім нервової також і у вісцеральних системах організму. На основі отриманих результатів варто звернути більшу увагу на TRPV1 як потенційну молекулярну мішень для дії нових фармакологічних засобів для спричиненої діабетом дисфункції сечового міхура.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на використанні цілого комплексу сучасних методів, у тому числі електрофізіологічних (петч-клемп реєстрації трансмембранних іонних струмів та змін мембранного потенціалу у режимі фіксації струму), молекулярно-

біологічних (дослідження експресії генів методами ПЛР), імуноцитохімічних, кальційметрії (визначення відносних змін в концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} за допомогою флуоресцентного Ca^{2+} -чутливого зонда Fluo-3, а також функціональної оцінки за допомогою *in vitro* тензометрії для реєстрації скорочень гладеньком'язових смужок. Кожен з цих методів має як переваги, так і певні обмеження, але у своїй сукупності отримані різними методами дані дають підстави для формування досить цілісних уявлень щодо експресії та функції TRPV1 у сечовому міхурі.

Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості спостережень, їх адекватному статистичному аналізу, а також їх обговоренні в контексті літературних даних у цій галузі досліджень. Шаропов Б.Р. показав себе компетентним фахівцем, хто засвоїв ряд сучасних методів дослідження, добре обізнаний з науковою літературою по досліджуваній ним проблемі і здатний до комплексного, а головне - критичного аналізу своїх результатів.

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

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках 2 науково-дослідних робіт, а також у рамках цільової програми «Геном людини».

Структура і обсяг дисертації

Дисертаційна робота Шаропова Б.Р. представлена за загально-прийнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 126 сторінках, що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літературних даних, описів матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень та їх

обговорення, висновки та список цитованої літератури (184 джерел). Отримані результати проілюстровані 31 рисунками, які дають повне уявлення про кількість і якість проведених експериментів. Крім того, робота містить 3 узагальнюючі схеми, які ілюструють підсумки дослідження та допомагають краще оцінити суть отриманих результатів та їх взаємозв'язок в різних частинах цього дослідження.

У вступі окреслено коло питань стосовно експресії та функції TRPV1 у сечовому міхурі та його можливої ролі в регуляції скоротливої активності цього органа, обґрунтовано актуальність і важливість дослідження, чітко сформульовано мету та завдання дослідження, пояснено зв'язок роботи з науковими програмами відділу, де вона виконувалася, наукову новизну, теоретичне та практичне значення цього дослідження, а також представлені відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації результатів і публікацій за результатами дослідження.

В розділі 1 (Огляд літератури) автор висвітлює сучасний стан досліджуваної проблематики. Цей розділ містить 3 підрозділів, які в свою чергу також структуровані у 8 окремих частинах, в яких автор послідовно розглядає питання анатомічної будови і гістологічної структури стінки сечового міхура, електрофізіологічних властивостей детрузора, а далі переходить до аналізу літературних даних щодо будови, біофізичних та фармакологічних властивостей TRPV1 і механізмів регуляції цього каналу як в нормі, так і при різних патологічних станах. Окремо аналізуються молекулярні та біохімічні механізми порушення функції різних типів клітин при цукровому діабеті. Весь аналіз має безпосереднє відношення до теми дисертаційної роботи.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) пояснені методи отримання та роботи з ізольованими клітинами різних типів (гладеньком'язові клітини детрузора, нейрони ДКГ), молекулярні методи визначення рівня експресії в них TRPV1, використані в роботі конфігурації

методу петч-клемп та протоколи цих експериментів, методи ідентифікації специфічної субпопуляції нейронів ДКГ, що іннервують сечовий міхур, а також методи оцінки функціональної ролі TRPV1, а саме кальційметрії та *in vitro* тензометрії. Всі експериментальні методи, а також підходи до статистичного аналізу відповідають меті і завданням дослідження і є адекватними для їх вирішення.

В розділі 3 (Результати досліджень та їх обговорення) наведені основні результати досліджень. У логічній послідовності автор переходить від демонстрації експресії TRPV1 переважно в нейронах ДКГ до аналізу його функціональної ролі у зазначеній субпопуляції нейронів ДКГ, потім в ізольованих гладеньком'язових клітинах детрузора, і вже на основі цих результатів розпочинає аналіз можливої участі TRPV1 в патофізіологічних процесах, що спричиняють діабетичну дисфункцію сечового міхура.

Для кожної серії проведених експериментів проводяться паралелі з даними літератури, підкреслюється новизна, відповідність або ж ті чи інші протиріччя з даними інших дослідників, обговорюються результати контрольних експериментів тощо. Загалом в цій частині Шаропов Б.Р. продемонстрував свою обізнаність з проблематикою дослідження та критичний підхід до інтерпретації отриманих ним результатів, що дуже важливо для молодого науковця.

Висновки роботи сформульовані чітко, вони відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані в 11 статтях та тезах конференцій, вони доповідались на декількох конференціях, серед яких варто відмітити VII з'їзд Українського біофізичного товариства (2018 р.), конгрес Біофізичного товариства США (2017 р.), а також спеціалізований міжнародний симпозіум «Smooth Muscle Physiology, Biophysics & Pharmacology: From genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities», який проходив у

Києві у 2017 р. В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені і проілюстровані основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні **запитання та зауваження:**

1. В огляді літератури варто було б приділити більшу увагу блокаторам TRPV1. Так, капсазепін і ВСТС, що були використані в експериментах, лише згадуються в одному реченні на с. 39. Особливо важливим у контексті даного дослідження був би аналіз літературних даних щодо селективності та можливих інших (крім TRPV1) фармакологічних мішеней як агоністів, так і антагоністів TRPV1, що були використані у цьому дослідженні.
2. Огляд літератури, розділ 1.3 «Діабетична дисфункція сечового міхура»: у цьому розділі детально розглянуті молекулярні та біохімічні механізми дисфункції клітини при діабеті, але він майже не торкається власне діабетичної дисфункції сечового міхура.
3. Методи: хоча в авторефераті і зазначається, що «Імунохімічні дослідження здійснювалися за допомогою TRPV1-специфічних антитіл, візуалізованих вторинними антитілами, кон'югованими із барвником Alexa Fluor 647», методика імуноцитохімічних досліджень варто було б деталізувати в тексті дисертації. Варто було б також зазначити швидкість зміни розчину, адже в роботі широко використовувався фармакологічний аналіз.
4. Методи (підрозділ 2.4.3), Результати та їх обговорення (підрозділ 3.1) та Рис. 3.2 – ПЛР описано досить поверхнево, на рисунку не позначена кількість пар основ для продуктів і чи відповідає вона очікуваній для використаних праймерів. На с. 51 зазначається, що «Послідовності

праймерів для ампліфікації цільових фрагментів *Trpv1* та рефересного гена *Actb* представлені у Табл. 1», але ця таблиця у роботі відсутня.

5. Рис. 3.8: репрезентативна клітина має потенціал спокою у межах $-25\text{...}-35$ мВ, що дійсно спричиняє інактивацію потенціалзалежних Ca^{2+} каналів і може бути причиною відсутності потенціалів дії. Але гіпреполяризація клітин вхідним струмом протягом 1 сек є недостатньо тривалою для повного виходу кальцієвих каналів з інактивованого стану. Тому ці експерименти не можна вважати достатньо переконливими, щоб зробити висновок про електричну незбудливість детрузору, тим більше що іншими дослідженнями була продемонстрована збудливість цих клітин, як це коректно зазначається далі на с. 71.
6. Є певні протиріччя між даними, що наведені у розділах 3.2.3 і 3.2.4, адже вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму при додаванні капсаїцину (Рис. 3.10) мало б принаймні супроводжуватися активацією Ca^{2+} -залежних калієвих та/або хлорних каналів, чого не спостерігається на Рис. 3.9.
7. Субклітинна локалізація TRPV1 та його участь у вивільненні іонів кальцію з саркоплазматичного ретикулуму загалом відповідає сучасним уявленням про можливість такої функції як для TRPV1, так і для інших підтипів TRP каналів, зокрема для рецептору холоду і ментолу TRPM8. Більше того, патерн внутрішньоклітинної локалізації TRPV1 дуже нагадує такий для збагаченого на ріанодинові рецептори «глибинного» саркоплазматичного ретикулуму, як ми це раніше показали для міоцитів тонкого кишечника (Gordienko, Zholos, 2004). Тим не менше, варто було б провести прості і показові додаткові тести для підтвердження або спростування запропонованої гіпотези щодо ролі TRPV1 у вивільненні кальцію, а саме: (i) тест у безкальцієвому розчині з метою повного виключення можливості надходження Ca^{2+}

- ззовні та (ii) тест із спустошенням кальцієвих запасників у присутності 10 мМ кофеїну або шляхом додавання блокаторів кальцієвих насосів.
8. Слід враховувати, що капсаїцин може викликати вивільнення Ca^{2+} з депо через ріанодинові рецептори, тобто без участі TRPV1, як це було показано для ДКГ нейронів (Eun et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 285(5):1114-1120). Неспецифічні ефекти відомі і для блокаторів TRPV1 – капсазепіна та ВСТС. Тому в якості контрольних експериментів варто було б перевірити дію капсаїцину на фоні блокаторів TRPV1.
 9. Рис. 3.32 ілюструє, що амплітуда скорочень сечового міхура зменшується при збільшенні концентрації капсаїцину. Як це можна пояснити, особливо із врахуванням того, що перед цим було показано, що капсаїцин викликає підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію в ізольованих міоцитах (рис. 3.10), що, як відомо, власне і активує скорочення м'язів?
 10. При обговоренні результатів було б важливо крім продемонстрованого у роботі підвищення рівня експресії TRPV1, серед гіпотетичних інших механізмів, що лежать в основі збільшення амплітуди TRPV1-опосередкованих струмів в ДКГ нейронах приділити увагу двом класичним механізмам сенситизації TRPV1, адже обидва мають безпосереднє відношення до патогенезу цукрового діабету. Мова іде про сигнальні ланки діабет – збільшення рівня ДАГ - активація ПКС – сенситизація TRPV1 та оксидативний стрес – ковалентна модифікація цистеїнових залишків - сенситизація TRPV1. Тим більше, що як надмірний синтез ДАГ, так і оксидативний стрес при діабеті були розглянуті в огляді літератури.
 11. В роботі трапляються деякі неточні або невдалі терміни: «IP₃ – інозитол-3-фосфат» (це інозитол-1,4,5-трисфосфат), «NE – норепінефрин» (загальноприйняте норадреналін), «STZ-проколотої

групи», «сигналювання» (краще сигналізація), «Ca²⁺-інфлюкси», «"пермісивний" компонент сигнального шляху», «дані є валідними» тощо.

Висловлені зауваження та побажання до подальших досліджень суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Шаропова Біжана Рашидовича *"Експресія та функція капсаїцинового рецептора TRPV1 у сечовому міхурі щура в нормі та при патології"*, відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

Офіційний опонент
завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики
ННЦ "Інститут біології та медицини"
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.

*Згідно з вимогами
Зак. державного
ННЦ 'ІБМ'*

