

## **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

**про науково-практичну цінність дисертаційної роботи**

**Шкриль В'ячеслава Михайловича**

***“Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і  
нервових клітинах”***

**на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук**

**за спеціальністю 03.00.02 – біофізика**

### **Актуальність проблематики дисертаційного дослідження**

Ріанодинові рецептори (RyRs) є ключовими елементами у регуляції кальцієвого гомеостазу та кальцій-опосередкованої сигналізації у багатьох типах клітин, зокрема у м'язових (скелетних, серцевих, гладеньких) та нервових клітинах. Загально відомо, що кальцій відіграє ключову роль у багатьох процесах, включаючи ці іони є тригером скорочення м'язів, секреції нейромедіаторів та передачі сигналів у нервовій системі. При цьому останнім часом накопичується все більше даних щодо порушення у функціонуванні ріанодинових рецепторів як причини виникнення різних патологічних станів, таких як серцева аритмія, злаякісна гіпертермія, неврологічні захворювання, м'язові дистрофії тощо. Були визначені специфічні мутації у генах, що кодують ріанодинові рецептори, зокрема 1 і 2 підтипів, що є підставою віднести такі захворювання до каналопатій ріанодинових рецепторів. Таким чином, розуміння механізмів активації та регуляції RyRs може мати велике значення для удосконалення існуючих та розробки нових методів діагностики і лікування цих захворювань. Дослідження RyRs і кальцієвої сигналізації є актуальними з наукової точки зору через постійний розвиток методів дослідження та розуміння нових аспектів функціонування клітинних систем. Розкриття нових механізмів регуляції кальцієвої сигналізації може відкрити нові перспективи у біології та медицині. Отже, дослідження ріанодинового рецептора та кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах є важливим напрямком, який має як фундаментальне, так і прикладне значення.

Дисертаційна робота Шкриль В.М. присвячена дослідженню клітинних та молекулярних механізмів, які залучені до регуляції внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації у збудливих клітинах шляхом вивчення ролі ріанодинових рецепторів. Виявлення участі ріанодинових рецепторів в кальцієвій сигналізації збудливих клітин є однією з пріоритетних задач сучасних медико-біологічних досліджень. Таким чином, актуальність досліджень, що були проведені у цьому напрямку Шкриль В.М., не викликає жодних сумнівів.

Одна з найбільш важливих задач цього дослідження полягала у біофізичній характеристиці можливості кальцій-індукованого вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулула в збудливих клітинах, що приводить до значного посилення кальцієвого сигналу в процесі спряження збудження і скорочення у м'язових клітинах та регуляції збудливості і процесів збудження нервових клітин. Іншим не менш актуальним аспектом роботи, якому присвячена значна її частина, є вивчення кальцієвих спарків (Ca sparks), тобто елементарних

(високолокалізованих і короткотривалих) актів вивільнення кальцію, які є результатом активації невеликої кількості близько розташованих р'янодинових рецепторів та є тими складовими елементами, з яких формується глобальний внутрішньоклітинний кальцієвий сигнал, часто у формі кальцієвих хвиль.

У роботі були застосовані нові біофізичні підходи для реєстрації та аналізу як локальних, так і глобальних кальцієвих сигналів шляхом багатовимірної, надшвидкої конфокальної скануючої мікроскопії. Актуальність цієї роботи полягає у теоретичному узагальненні та експериментальному вирішенні наукової проблеми щодо ролі р'янодинових рецепторів у регуляції концентрації вільного кальцію у збудливих клітинах на прикладах скелетних і серцевих м'язів, а також нейронів, що дозволило автору цього дослідження зробити суттєвий внесок у розвиток сучасних концепцій молекулярних і біофізичних основ кальцій-індукованого вивільнення кальцію.

### **Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення**

Автор ланого дисертаційного дослідження отримав ряд нових даних, або таких, що суттєво уточнюють та розвивають сучасні уявлення щодо молекулярних, клітинних та біофізичних механізмів, які залучені у процесах активації та регуляції р'янодинових рецепторів.

Зокрема Шкриль В.М. продемонстрував:

- вперше було показано, що кальцій, який входить у клітину та вивільнюється з внутрішньоклітинних депо, можливо достовірно розділити на рівні окремих центрів вивільнення кальцію в кардіоміоцитах як у часі, так і просторі;
- вперше було вивчено властивості  $\text{Ca}^{2+}$  спарків, що зареєстровані у місці вивільнення кальцію від групи каналів RyRs другого типу; доведено одно модальний розподіл амплітуди таких  $\text{Ca}^{2+}$  спарків;
- прямими вимірами показано, що в міоцитах передсердь рефракторність механізму вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з саркоплазматичного ретикулуму є ключовим причинним механізмом виникнення  $\text{Ca}^{2+}$ -альтернацій, як важливий механізм утворення серцевої аритмії;
- встановлено, що дисбаланс ROS сигналів призводить до появи  $\text{Ca}^{2+}$  спарків в скелетних м'язах ссавців; при цьому збільшення мітохондріального кальцію та посилення утворення мітохондріального ROS призводить до підсилення аномальних сигналів  $\text{Ca}^{2+}$ ;
- показано неспроможність  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR) з CP при активації RyRs першого типу кальцієм в скелетних м'язах миші; у той же час за фізіологічних умовах були зареєстровані CICR-відповіді у скелетном'язових волокнах жаби;
- показано, що у пірамідальних нейронах гіпокампу щурів вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуму при відкритті RyRs третього типу відбувається лише при довготривалій електричній стимуляції.

Ці наукові положення фундаментального характеру самі по собі мають вагоме практичне значення, адже вони визначають шляхи регуляції кальцієвого сигналу при зміні активності як RyRs.

З точки зору практичної цінності цього дослідження слід зазначити, що Шкриль В.М. зробив важливі експериментальні кроки в дослідженні серцевих альтернацій, пошкодженнях м'язових волокон при Дюшеновій дистрофії м'язової тканини, а також при оксидативному стресі, що супроводжує значну кількість захворювань різного генезу, наприклад цукровий діабет, атеросклероз та ішемія. Тому розуміння процесів, які регулюють активність RyRs, має вирішальне значення для розробки відповідних терапевтичних стратегій для корекції різних патофізіологічних станів.

Таким чином, отримані результати мають як фундаментальне, так і практичне значення. Вони суттєво розвивають та доповнюють сучасні уявлення щодо молекулярних механізмів процесів спряження збудження і скорочення як у кардіоміоцитах, так і в скелетних м'язових волокнах, а також розуміння ролі кальцій-залежних функцій у нервових клітинах.

### **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи**

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на значному масиві різнопланових експериментальних даних, які були отримані з використанням комплексу сучасних біофізичних методів, у тому числі електрофізіологічних (петч-клемп реєстрації трансмембранних іонних струмів в режимі фіксації напруги), фармакологічних, молекулярно-біологічних (дослідження експресії генів методами ПЛР), конфокальної та епіфлуоресцентної кальційметрії при використанні флуоресцентних  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливих барвників Fluo-4, Fluo-5N, Fura-2, Mag-rhod-2, а також активних форм кисню з використанням флуоресцентного барвника CM-H2DCFDA; флеш-фотолізу зв'язаного кальцію для швидкої зміни локальної концентрації кальцію; математичного та статистичного аналізу. Різні методичні підходи вдало доповнюють один одного, а у своїй сукупності вони дозволили комплексно дослідити широке коло питань. Дані, які були отримані різними методами, дають підстави зробити висновок щодо високого ступеню обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи. Також слід відмітити значну кількість проведених експериментів в кожній їх серії та адекватний статистичний аналіз даних.

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

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де виконувалась робота Шкриля В.М., є одним із відомих наукових центрів дослідження кальцієвих сигналів у збудливих клітинах. Дана дисертаційна робота була виконана згідно з тематичними планами декількох науково-дослідних робіт відділу загальної фізіології нервової системи (пізніше відділу біофізики іонних каналів), а також у межах міжнародного співробітництва за програмою "Клітинні системи в нормі на патології" в Університеті Медицини та Стоматології Нью-

Джерсі, США та Медичному Центрі Університету Раш, Чикаго, США при співпраці з проф. Н. Широковою Школи Медицини Нью-Джерсі Університету Медицини та Стоматології Нью-Джерсі (Ньюарк, США), проф. Л. Блатером та проф. Е. Ріусом Медичного центру Університету РАШ (Чикаго, США).

### **Зміст дисертаційної роботи**

У вступній частині роботи обґрунтовано актуальність дослідження молекулярних та клітинних механізмів активації ріанодинових рецепторів, приділено увагу кальцій-зв'язувальним білкам, а також участі обмінників або pomp, які забезпечують виведення кальцію з цитозолу клітини і які відповідальні за динаміку змін внутрішньоклітинної концентрації кальцію в м'язових і нервових клітинах. У логічній послідовності представлені дані, які характеризують:

- компонент кальцієвого сигналу що виникає як наслідок активації потенціал-керованих кальцієвих каналів (VGCC), іонотропних каналів - рецепторів глутамату (NMDA) та ацетилхолінових рецепторів, а також каналів транзйєнтного рецепторного потенціалу (TRPV каналів) плазматичної мембрани;
- вивільнення кальцію з ендосаркоплазматичного депо за рахунок відкривання каналів інозитол-1,4,5-трисфосфатних рецепторів (IP<sub>3</sub>Rs) та/або ріанодинових рецепторів та складається з дискретних подій вивільнення Ca<sup>2+</sup>, які можуть бути візуалізовані за допомогою лазерної конфокальної флуоресцентної мікроскопії та флуоресцентних Ca<sup>2+</sup>-чутливих барвників і отримали назву Ca<sup>2+</sup> спарків;
- мітохондріальне поглинання кальцію, що вивільнюється з депо та утворення активних форм кисню та АТФ, що в свою чергу можуть впливати на активність ріанодинових рецепторів;
- охарактеризовані деякі захворювання м'язової тканини, такі як аритмії міокарду та м'язова дистрофія Дюшена.

Основна частина роботи стосується досліджень ролі ріанодинових рецепторів у формуванні кальцієвого сигналу в збудливих клітинах. Робота складається з трьох розділів, а саме: зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію у кардіоміоцитах; транзйєнтні зміни внутрішньоклітинного кальцію у скелетному м'язі за рахунок вивільнення з саркоплазматичного ретикулуму та кальцієва сигналізація у нейронах гіпокампу. Послідовно в кожному розділі показано зміну кальцієвого сигналу при активації різних типів ріанодинових рецепторів. Зокрема у кардіоміоцитах, де експресується другий тип RyRs, існує чітка функціональність кальцій індукваного вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму при відкритті RyRs та наявності кальцієвих спарків за фізіологічних умов. У скелетном'язових волокнах, де виявлено експресію першого типу RyRs, CICR за фізіологічних умов не активується, але при сенситизації ріанодинових рецепторів у присутності кофеїну та 4-СМС кальцій-індукована активація проявляється. У пірамідальних нейронах гіпокампу, де переважно присутній третій тип RyRs, ріанодинові рецептори активуються тільки при значній, довготривалій стимуляції клітини.

Варто підкреслити, що при виконанні цього дисертаційного дослідження автором була приділена значна увага удосконаленню методичних підходів як реєстрації змін кальцієвого сигналу, так і аналізу та розрахунку концентрації вільного кальцію, змін потоку кальцію. Автором були розроблені:

- вперше запропоновано методичні підходи дослідження  $\text{Ca}^{2+}$  спарків у місці вивільнення з СР на основі тривимірною конфокального сканування рівня флуоресценції;
- запропоновано методичні підходи для вивчення біофізичних процесів збудливих клітин, які базуються на швидкісній конфокальній візуалізації для дослідження  $\text{Ca}^{2+}$  сигналів з високою часовою роздільною здатністю з можливістю розділення по всій клітині;
- була адаптована та модифікована формула Грінкевича для визначення вмісту вільного кальцію в клітині при двох хвильовому методі збудження флуоресцентного барвника при використанні ПЗЗ камери;
- запропонований новий метод просторової, складної, дифракційно-обмеженої фотоактивації та фотовивільнення в живих клітинах.
- був розроблений підхід, який розширює чутливість кількісної концентраційної візуалізації до приблизно 1000-кратного діапазону концентрацій і з необхідними рівняннями для інтерпретації флуоресцентних зображень, отриманих за допомогою пари флуоресцентних барвників з однаковим флуорофором, але різною константою дисоціації для кальцію.

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

Представлені у дисертаційній роботі результати були опубліковані в 12 статтях у журналах віднесених до першого і другого квантилів (Q1 і Q2) та 5 статтях віднесених до третього і четвертого квантилів (Q3 і Q4) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, одним розділом у нейрофізіологічному нарисі, патентом на корисну модель та 27 тезах міжнародних конференцій та з'їздів. Результати дисертаційного дослідження були також апробовані на ряді фахових національних та міжнародних форумів, таких як конгреси Українського товариства нейронаук, Українського біофізичного товариства, Американського біофізичного товариства (США), Українського фізіологічного товариства та інших.

В рефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені, проілюстровані і обговорені основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження:

1. Чи враховувались при кількісних розрахунках кальцій-зв'язувальні буферні системи клітини, і якщо так, то як саме? У розділі 1.3 зазначається, що розрахунок потоків кальцію вимагав визначення концентрації і кінетичних параметрів буферних кальцієвих систем і систем виведення кальцію. Ці параметри наведені у включеній у роботу статті, але варто було б їх деталізувати також і у тексті дисертації. Яким було співвідношення

між кількістю вивільнених іонів кальцію і іонів, які захоплювались буферними системами та виводились з цитозолу? Зокрема на Рис. 1.7D наведено часовий профіль просторового максимуму флуоресценції, розрахованого вільного  $[Ca^{2+}]$ , потоку вивільнення і струму вивільнення для усереднених зображень кальцієвих спалахів, але відсутній профіль для зв'язаного та виведеного з цитозолу кальцію.

2. Аритмія передсердь не є настільки загрозливим розладом електричної активності серця, як аритмія шлуночків. Тому виникає питання, чому у цих дослідженнях основна увага була приділена дослідженню ролі ріанодинових рецепторів у кардіоміоцитах передсердь.
3. Чи спостерігались у кардіоміоцитах або нейронах сайти, де переважним чином відбувається спонтанне вивільнення кальцію при синхронній активації групи ріанодинових рецепторів аналогічно frequent discharge sites [FDSs] у міоцитах судин (Gordienko, Greenwood, Bolton, Cell Calcium 2001, doi: 10.1054/celca.2000.0180).
4. Що відомо про характер відкривання ріанодинових рецепторів в їх кластері з точки зору залежного чи незалежного їх відкривання? Наскільки можливо перевірити біноміальний розподіл на основі отриманих даних?
5. У розділі 1.3 проведена оцінка кількості ріанодинових рецепторів (N), що генерують спарк (20-30 каналів). Ці розрахунки базуються на оцінках величини елементарного струму через один іонний канал (i), але не враховують ймовірність знаходження каналів у відкритому стані (Po). Оскільки  $I=iNPo$ , така оцінка може бути заниженою, якщо  $Po \ll 1$ .
6. Кількісні дані, які наведені у розділі 1.6 (наприклад середнє співвідношення коефіцієнта альтернації становило  $0.54 \pm 0.03$  для j-SR і  $0.61 \pm 0.04$  для nj-SR (n=10)) варто було доповнити відповідним статистичним аналізом, який би підтвердив відсутність статистично значимих відмінностей. Кількісні дані стосовно можливості безпосереднього поглинання іонів кальцію, що були вивільнені з саркоплазматичного ретикулуму, мітохондріями (с. 133-134) також варто було б доповнити відповідним статистичним аналізом стосовно статистично значущих відмін між ЕГТА і ВАРТА. Аналогічні статистичні тести варто було б зробити і для даних, які наведені у розділі 2:2 стосовно різниці у часі появи Ca спарків після пермеабілізації скелетном'язових волокон різних типів, при дії L-глутамату, D-глутамату чи аспартату та після додавання супероксиддисмутази, каталази або  $H_2O_2$  (с. 145-149).
7. У розділі 1.6 аналізуються фактори, що лежать в основі  $Ca^{2+}$  альтернацій у міоцитах передсердь і робиться висновок про те, що відновлення рефрактерності та реституції вивільнення  $Ca^{2+}$  з СР є ключовими факторами для генерації  $Ca^{2+}$  альтернацій. Яку роль у цих процесах відіграє потенціал- і Ca-залежна інактивація ріанодинових рецепторів (наприклад, як це було показано у дослідженнях Laver, Lamb, 1998 doi: 10.1016/S0006-3495(98)77944-5)?

8. У роботі проведено порівняльний аналіз здатності штучного локалізованого підвищення концентрації кальцію (SLICs) шляхом флеш-фотолізу викликати  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення кальцію у скелетном'язових волокнах амфібій та ссавців і було показано, що у скелетном'язових волокнах миші ріанодинові рецептори не активуються при концентрації кальцію до 8 мкМ. На основі цих результатів робиться висновок про те, що CICR навряд чи має фізіологічне значення у процесах спряження збудження і скорочення у скелетних м'язах ссавців. Такий висновок ймовірно є ще дещо передчасним, тому що це питання до сих пір залишається дискусійним. Зокрема при інтерпретації даних флеш-фотолізу кальцію потрібно враховувати давно встановлений феномен у кардіоміцитах шлуночків, де фізіологічне значення CICR у процесах спряження збудження і скорочення не викликає сумнівів, а саме - вхід  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкервані  $\text{Ca}^{2+}$  канали, але не більш генералізоване підвищення внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  шляхом флеш-фотолізу "caged"  $\text{Ca}^{2+}$ , спричиняє активацію  $\text{Ca}^{2+}$  спарків (Lipp, Niggli, 1996; doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021286).
9. Зараз існує дві основні концепції спряження між входом  $\text{Ca}^{2+}$  через потенціалкервані  $\text{Ca}^{2+}$  канали плазматичної мембрани і ріанодиноними рецепторами саркоплазматичного ретикулуму, які дістали назву щільного (tight coupling) і вільного (loose coupling). Перше з них притаманне кардіоміоцитам, а друге – гладеньком'язовим клітинам. Чи можна віднести досліджуване у роботі  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  у пірамідних нейронах гіпокампу щурів до одного з цих типів? Зокрема, оскільки відмічалась суттєва різниця у здатності коротко- та довготривалої електричної стимуляції клітин викликати  $\text{Ca}^{2+}$ -індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , чи можна стверджувати, що у нейронах це спряження відбувається по типу loose coupling?

Ці питання носять в основному дискусійний характер та не впливають суттєво на загальну високу оцінку даної дисертаційної роботи.

### Висновок

Дисертаційна робота Шкриль В'ячеслава Михайловича "Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах", подана на здобуття наукового ступеня доктора наук в галузі знань 03 Біологічні (наукова спеціальність 03.00.02 «біофізика»), є завершеним науковим дослідженням, яке містить нові положення і науково обґрунтовані результати, які в цілому розв'язують важливу науково-практичну проблему – ріанодин рецептор опосередкованої регуляції кальцієвої сигналізації у скелетних м'язах, кардіоміоцитах та пірамідальних нейронах гіпокампу. Дана робота представлена у вигляді наукової доповідь за сукупністю статей, з яких не менше 10 були опубліковані у виданнях, що віднесені до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation

Reports, та цілком відповідає наказу Кабінету міністрів України №1220 від 23.09.2019 зі змінами внесеними згідно з Постановою Кабінету міністрів України № 496 від 27.05.2023 та № 285 від 08.03.2024 «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора і кандидата наук». Дослідження Шкриль В.М. відповідають і навіть перевищують ці критерії: загалом дисертаційна робота узагальнює результати досліджень, що були опубліковані у 12 наукових статтях, з них Q1 – 11 і Q2 – 1 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports.

Виходячи з актуальності, за об'ємом та рівнем досліджень, наукової новизни результатів, теоретичної та практичної цінності отриманих даних, об'єктивності та обґрунтованості висновків дисертаційна робота Шкриль В'ячеслава Михайловича "Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах" повністю відповідає вимогам пп. 7, 8, 9 «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук» затвердженого постановою Кабінету міністрів України № 1197 від 17.11.2021 зі змінами внесеними згідно з Постановою Кабінету міністрів України № 502 від 19.05.2023, та Наказу МОН України від 12.01.2017 № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за науковою спеціальністю 03.00.02 «біофізика».

Офіційний опонент  
завідувач кафедра біофізики та  
нейробиології ННЦ «Інститут біології та  
медицини» Київського національного  
університету імені Тараса Шевченка  
доктор біологічних наук, професор  
Олександр ЖОЛОС

