

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Коченова Артема Веніаміновича

"Збудливість гладеньком'язової клітини: вплив співвідношення іонотропних і метаботропних механізмів (модельні дослідження)"

представлену на здобуття наукового ступеню

кандидата біологічних наук

за спеціальністю 03.00.02 - біофізика

Актуальність напрямку досліджень

Дисертаційна робота Коченова А.В. присвячена з'ясуванню біофізичних, електрофізіологічних, кальцій- та рецептор-залежних механізмів, що обумовлюють електричну активність і регуляцію збудливості гладеньком'язової клітини (ГМК) детрузора. Особлива увага в роботі приділена варіаціям співвідношення між іонотропним пуриновим і спряженим з G-білками холінергічним компонентам парасимпатичних впливів на ці клітини.

Визначення ключових параметрів, що регулюють збудливість ГМК під впливом пуринергічної та холінергічної парасимпатичної регуляції є важливим і актуальним не тільки для більш глибокого розуміння процесів, що лежать в основі нейронального контролю функції детрузора, а і з огляду на можливості практичного застосування отриманих результатів у клінічній практиці, адже зміни співвідношень між вказаними компонентами спостерігаються при багатьох патологічних станах (наприклад, гіперактивний сечовий міхур), у тому числі і серед дітей. При цьому точні причини виникнення таких розладів потребують подальших досліджень.

Для дослідження вказаних механізмів автор використовує комп'ютерне математичне моделювання у програмному середовищі «NEURON». Методи

математичного моделювання широко застосовуються у біофізиці та інших біологічних науках, особливо коли проведення експериментів пов'язано з різного роду обмеженнями. Отже їх використання цілком відповідає вимогам часу та цілком відповідає поставленим автором задачам. Особливо слід відзначити, що центральним інструментом моделювання було програмне середовище NEURON. Саме такий підхід використовується суперкомп'ютером Blue Gene при виконанні масштабного міжнародного проекту Blue Brain, який було започатковано в Інституті Мозку і Мислення в Швейцарії в 2005 р. і який має на меті створення синтетичного мозку шляхом зворотної інженерії мозку людини на молекулярному рівні та дослідження архітектури і функції мозку.

В цьому контексті особливої уваги заслуговує визначення впливу варіацій в амплітудно-кінетичних параметрах іонотропного та метаботропного компонентів парасимпатичного стимулу на збудливість ГМК детрузора. Представлені результати мають важливе значення для розуміння біофізичних процесів, що викликають патологічні зміни активності ГМК, а також для оптимізації режимів реабілітаційної електростимуляції. Проведені автором модельні дослідження переважно стосуються визначення ефектів активації іонотропних та метаботропних механізмів при модулюванні їх інтенсивності та часової затримки між активацією відповідних P_2X та M_2/M_3 рецепторів.

Результати дисертаційної роботи демонструють, що зміни співвідношення між іонотропними та метаботропними механізмами (наприклад, при втраті або дисфункції мускаринових холіноцепторів) значною мірою впливають на збудливість ГМК детрузора, а за певних умов можуть робити неможливим генерацію високоамплітудного потенціалу дії, а отже і скорочення ГМК.

Наукова новизна отриманих результатів полягає у створенні комплексної моделі ГМК детрузора, за допомогою якої вперше було досліджено електричні та кальцій-залежні процеси у міоцитах детрузора, що розвиваються при дії електричних і парасимпатичних стимулів, у тому числі організованих у відповідності з типовими протоколами, які застосовуються під час проведення реабілітаційної електричної стимуляції. Конкретизовано роль, яку в цих процесах відіграють як часові параметри електростимуляції, так і кінетичні характеристики іонних каналів, насосів і процесів буферизації/дифузії внутрішньоклітинного кальцію.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження

Найбільш важливими складовими частинами дисертаційного дослідження є наступні:

- Розробка кінетичної моделі $I_{Cl(Ca)}$ і встановлення ролі Ca^{2+} -залежних хлорних каналів у збудливості ГМК детрузора від час його парасимпатичній стимуляції;
- визначення можливості компенсації послабленого внаслідок дефіциту м-холінорецепторів кальцієвого транзйенту за рахунок активації (наприклад, з використанням екзогенних агоністів рецепторів) іонотропних пуриноцепторів;
- з'ясування впливу зміни співвідношення між іонотропними та метаботропними механізмами на збудливість та процеси збудження ГМК детрузора при поодинокій та множинній стимуляції.

Отримані результати мають фундаментальне та прикладне значення, істотно доповнюють сучасні уявлення про механізми збудження ГМК детрузора за різних умов. Вони можуть бути використані для оптимізації протоколів реабілітаційної електростимуляції.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи.

Наукові положення, наведені в дисертації, базуються на використанні сучасних методів комп'ютерного математичного моделювання та відповідного програмного забезпечення, достатній кількості обчислювальних експериментів, аналізі результатів, їх обговоренні в контексті літературних даних у даній галузі досліджень. Коченов А.В. показав себе досвідченим, компетентним експериментатором і аналітиком, добре обізнаним з науковою літературою у досліджуваній проблематиці, здатним до критичного аналізу власних результатів.

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

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України у рамках держбюджетної теми «Біофізичні механізми метастабільності фізіологічних станів клітин, що зазнають іонотропних та метаботропних впливів» (номер державної реєстрації 0114U000909).

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота Коченова А.В. представлена за загальноприйнятою формою у повній відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 170 сторінках, що включає в себе вступ, огляд літературних даних, матеріалів і методів досліджень, опис результатів власних досліджень, обговорення і узагальнення результатів досліджень, висновки, додатки та список цитованої літератури (204 найменування). Отримані результати ілюстровані 24 рисунками, які дають повне уявлення про значну кількість і високу якість експериментів.

У вступній частині роботи сформульовано проблематику дослідження ролі співвідношення між іонотропними пуриновими і метаботропними мускариновими компонентами у клітинній збудливості, обґрунтовано актуальність і важливість дослідження, сформульовано мету та завдання

дослідження, підкреслено новизну роботи та представлено відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації результатів і публікацій за результатами дослідження. Добре обгрунтована доцільність математичного моделювання для вивчення відповідної проблематики в якості ефективного альтернативного методу (зокрема пояснена видоспецифічність експресії тих чи інших рецепторів і каналів що стосується моделей на тваринах).

В розділі 1 (Огляд літературних даних) автор висвітлює сучасний стан досліджуваної проблематики. Цей розділ складається з чотирьох основних підрозділів. В першому розглянуто нервову регуляцію клітин детрузора та характеристики порушень утримання сечі та сечовипускання. У другому підрозділі описано механізми регуляції активності ГМК детрузора, розглянуто взаємозв'язок між змінами мембранного потенціалу та розвитком скорочення ГМК. У третьому підрозділі описано біофізичні механізми регуляції ГМК, визначено основні типи іонних каналів, насосів, рецепторів та інших механізмів, які регулюють збудливість та процес збудження вказаного типу клітин. Крім того, детально описано їх можливу роль у нормі та при патології. В четвертому розділі зазначено доцільність використання математичного моделювання як інструменту дослідження, зокрема для побудови моделей ГМК детрузора.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) описано програмне середовище для математичного моделювання «НЕЙРОН» та розроблену в ньому комплексну модель ГМК ДСМ. Описано моделі іонних каналів, насосів, механізми внутрішньоклітинної динаміки кальцію та протоколи обчислювальних експериментів, у тому числі такі, які застосовуються при реабілітаційній електростимуляції. Для більшості окремих провідностей наведені літературні джерела, на основі яких обирались ті чи інші коефіцієнти в рівняннях, що описують іонні струми.

В розділі 3 (Результати досліджень) представлено характеристики Ca^{2+} -залежного хлорного струму, особливості динаміки потенціал- і кальційзалежної активації струму. Визначено біофізичні механізми електричного і парасимпатичного збудження, у тому числі при різних співвідношеннях між іонотропним та метаботропним компонентами, що дозволило визначити вплив зміни співвідношення між названими компонентами на збудливість досліджуваного типу клітин.

Описано особливості біофізичних процесів у ГМК ДСМ при періодичній електричній та парасимпатичній стимуляції, розглянуто струми при генерації відповідей на таку стимуляцію. Запропоновано шляхи оптимізації існуючих протоколів реабілітаційної електростимуляції.

В заключному розділі (Обговорення результатів) особлива увага приділена розробленій новій моделі Ca^{2+} -залежного хлорного струму, аналізується молекулярна природа канал-формуєчих протеїнів, кінетика його активації тощо. Автор критично розглядає переваги та обмеження комплексної моделі ГМК детрузора, відносну роль різних іонних струмів, роль метаботропних і іонотропних механізмів у збудливості ГМК детрузора. Даний розділ повністю відображає суть проведених досліджень та отриманих результатів. Однією з найбільш цікавих, але і значною мірою дискусійних проблем, яке ставить це дослідження, є проблема взаємозв'язків між електричною активністю ГМК і динамікою змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію.

Висновки роботи в основному чітко сформульовані, вони цілком відповідають поставленим завданням, повністю базуються на отриманих результатах.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті

Матеріали дисертації опубліковані у 7 статтях у наукових фахових журналах, 6 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій. Опубліковані праці свідчать про повноту викладу наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені і проілюстровані основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена суть роботи.

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

1. У чому полягає роль $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ обмінника в ГМК детрузора, і чому цей механізм регуляції концентрації іонів кальцію не врахований при моделюванні електричної активності цих клітин?
2. Чому прототипом для моделювання $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ в ГМК був обраний $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ у гепатоцитах?
3. «Після короткого (~ 3 мс) спаду $[\text{Ca}^{2+}]_i$ відновляла зростання до пікового значення 295 мкМ». Чи не занадто високою є ця величина? Припускають, що такі високі концентрації кальцію можуть виникати локально, у мікродоменах, але навряд чи вони можливі глобально, тобто у всьому цитозолі клітини.
4. Генерація STICs є характерною властивістю ГМК детрузора. Чи можливо отримати STICs в розробленій автором моделі цих клітин?

В цілому, високо оцінюючи дисертаційну роботу Коченова А.В., потрібно зробити деякі зауваження та висловити **побажання** щодо подальшого розвитку цих досліджень:

1. Методика, розділ 2.3: в моделі є велика кількість різних коефіцієнтів, і варто було б дати посилання на літературні джерела, на основі яких були визначені кількісні параметри моделі для кожної з її складових

частин. Зокрема, така вихідна інформація відсутня для струмів через Na^+ і K^+ канали.

2. В огляд літератури (розділ 1.2) зазначається, що «Подальше тривале підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ залучає надходження зовнішньоклітинного Ca^{2+} через багато різноманітних шляхів, включаючи: депозалежні Ca^{2+} -канали (SOCC), потенціалзалежні Ca^{2+} -канали, пурінергічні рецептори, канали сімейства TRP (transient receptor membrane potential channels) та $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмінник». Можна побажати, що подальший розвиток моделі врахує всі ці процеси. Зокрема, слід відмітити, що нещодавно була визначена важлива роль TRPC4 β в холінергічному скороченні ГМК детрузора (Griffin et al., J Urol, 2016).
3. Наскільки модель враховує пригнічення потенціалзалежного кальцієвого струму при активації мускаринових холіноцепторів? Це відомий феномен (наприклад, Pucovsky et al. Eur J Pharmacol 1998), який варто додати до моделі при її подальшій деталізації.
4. Деякі параметри моделі (наприклад, щільність струму в мкА/мкФ, питома провідність мембрани в мкСм/см²) варто було б одночасно давати у перерахунку на одну клітину, що має ємність приблизно 50 пФ і відповідно площу мембрани приблизно 5000 мкм². Це полегшило б порівняння цих параметрів з даними електрофізіологічних експериментів на реальних клітинах.
5. Висновок 7 варто було б конкретизувати, тобто пояснити, у чому саме полягає «характерний чин».
6. В роботі трапляються деякі неточні або невдалі терміни: «детрузор сечового міхура» (детрузор – це і є ГМ, що знаходиться у стінці сечового міхура); «спонтанних перехідних вхідних струмів (STICs – spontaneous transient inward currents)» (краще спонтанних транзйєнтних вхідних струмів); «Зменшення рушійного потенціалу» (краще електрорушійної сили); часто зустрічається «гладкі м'язи»,

хоча автор використовує також і «гладенькі м'язи» (правильним є останній варіант); «змінює висоту та тривалість ПД» (краще амплітуду ПД); «...повномасштабного поодинокого ПД» (краще повноцінного, або високоамплітудного ПД).

Слід підкреслити, що висловлені зауваження і побажання до подальших досліджень суттєво не впливають на загальну 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 Коченова Артема Веніаміновича *"Збудливість гладеньком'язової клітини: вплив співвідношення іонотропних і метаботропних механізмів (модельні дослідження)"*, відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а його автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

Офіційний опонент

професор і в.о. завідувача кафедри біофізики

ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.

