

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

доктора медичних наук, професора, завідувача відділу фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії ДУ «Інституту фармакології та токсикології НАМН України» **Соловйова Анатолія Івановича** на дисертацію аспіранта відділу нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О.

Богомольця НАН України **Єльяшова Семена Ігоровича** на тему:
«Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура», подану до захисту у спеціалізовану вчену раду (zareєстровану за номером 6322) Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України до розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія

1. Актуальність обраної теми

Дисертаційна робота Єльяшова Семена Ігоровича присвячена механочутливим властивостям сечового міхура та його гладеньком'язового шару. Це фундаментальне питання досі має незакриті питання, на яких і сконцентрована робота. Згідно з літературними даними, сечовий міхур має дві нервово-незалежні механочутливі реакції. Перша обумовлена розслабленням у відповідь на механічну стимуляцію, тоді як друга – навпаки, стимулюється напруження м'язу. Наразі достеменно відомо про функціональну присутність в гладеньком'язовому шарі лише одного, K^+ -провідного десенсибілізуючого каналу TREK-1, який вважають головним механочутливим рецептором. Цей канал приймає головну участь у механочутливій відповіді з розслабленням. Проте, природу каналу, що стимулює до механочутливого скорочення досі не досліджено. Існує ймовірність, що цим каналом може бути або неселективний іонний канал TRPV4, або неспецифічний механочутливий іонний канал Piezo1.

На встановленні природи Ca^{2+} -провідного каналу і фокусував своє дослідження Єльяшов С.І. Загалом, ідентифікація іонних каналів, які приймають участь у механочутливих відповідях м'язової тканини сечового міхура дозволить ідентифікувати фармакологічну мішень, що може бути використана для лікування розладів роботи сечового міхура.

Оскільки на сьогоднішній день немає повної картини щодо механочутливих іонних каналів в м'язовому шарі сечового міхура, дослідження, проведене в дисертаційній роботі Єльяшова С.І. є безумовно актуальним.

2. Наукова новизна отриманих результатів

В дисертаційній роботі вперше представлені електрофізіологічні характеристики неспецифічного, $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ -провідного механочутливого іонного каналу в гладеньком'язових клітинах. Здобувач навів докази неодноманітності відповіді клітин м'язового шару (3 типи відповідей) на механічну стимуляцію та вперше отримав Ca^{2+} -сигнали у відповідь на застосування агоніста каналу Piezo1 в ізольованій клітині гладеньком'язового шару сечового міхура. Крім цього, отримані результати можуть свідчити про існування непрямого зв'язку між Piezo1 та K^{+} -провідним каналом в цьому типі тканини, що також раніше не було описане для цього каналу.

3. Теоретичне і практичне значення отриманих результатів

Теоретичне значення отриманих результатів полягають доведенні існування механочутливого Ca^{2+} -провідного каналу, присутності Piezo1 та відсутності TRPV4 в гладеньком'язових клітинах сечового міхура щура та неопisanого раніше сигнального шляху між Piezo1 та K^{+} -провідним каналом.

Отримані фундаментальні результати можуть мати практичне значення для робіт з пошуку фармакологічних мішеней у лікуванні розладів та хвороб, пов'язаних з сечовим міхуром.

4. Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень і висновків дисертаційної роботи

Робота містить нові, раніше не відомі дані щодо механочутливості гладеньком'язової тканини сечового міхура, що були продемонстровані значною кількістю сучасних методів молекулярної біології та електрофізіології. Результати представлені даними, що були проаналізовані за допомогою відповідних методів статистичної обробки на достатній кількості даних, отриманих з необхідної кількості дослідних тварин. Крім цього Єльяшов С.І. апробував основні результати дисертації через публікацію 4-х статей у акредитованих журналах. Дисертація повністю відповідає спеціальності 091 «Біологія». Загальні висновки роботи ґрунтуються на статистично-достовірних результатах та відповідають поставленим задачам. Здобувач наводить кілька

гіпотез на основі отриманих результатів, однак чітко акцентує на недостатньому обґрунтуванні, зазначаючи необхідність додаткових досліджень.

5. Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Дисертаційна робота виконана у відділі Нервово-м'язової фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України під керівництвом завідуючого відділом – д.б.н., проф., академіка Шуби Ярослава Михайловича. Робота виконувалась в рамках відомчих тем НДР відділу: «Іонні канали – рецептори фізико-хімічних впливів у регуляції збудження-скорочення вісцеральних м'язів у нормі та патології» (номер реєстрації: ДР № 0118U007351), «Іонні канали як мішені фармакологічного впливу» (номер реєстрації: ДР № 0124U001683), «Роль TRPM8- і TRPV1- каналів у функціонуванні гладких м'язів уrogenітального тракту самців щурів» (номер реєстрації: ДР № 0116U004470) а також грантового проекту Національного Фонду Досліджень України «Міогенні механізми механочутливості сечового міхура в нормі і при діабеті 2-го типу» (номер реєстрації: ДР № 0120U104960).

6. Структура та зміст дисертації. Опрацьованість літературних джерел

Робота складається з наступних частин: Анотація, Огляд літератури, Матеріали та методи, Результати та їх обговорення, Висновки, Список використаних джерел. Увесь матеріал викладений на 140 сторінках з 12 малюнками в огляді літератури, 5 – в матеріалах та методах та 39 – у результатах та їх обговоренні. Робота написана з дотриманням вимог написання дисертацій згідно з наказом МОН України від 12 січня 2017 р. №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації».

Розділ «Огляд літератури» послідовно розкриває основні теоретичні відомості та сучасне розуміння механочутливості сечового міхура. Розділ поділений на пункти, де описується загальне уявлення про механочутливість як явище (підрозділ 1.1.), будову сечового міхура (підрозділ 1.2.), особливості механочутливих рефлексів цього органу (підрозділ 1.3.) та далі пояснює базис для механочутливих відповідей м'язового шару (підрозділ 1.4.). Дисертація містить 199 посилань на фахову літературу.

Розділ «Матеріали та методи» детально та доступно описує методику, побудову експериментів та базові принципи, необхідні для отримання достовірних даних. Робота отримала позитивний висновок з біоетики що засвідчує дотримання стандартів роботи з експериментними тваринами інституту фізіології ім. О.О. Богомольця, відповідних вимогам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), та чинного законодавства України з питань охорони лабораторних тварин.

Розділ «Результати та їх обговорення» викладений на 47 сторінках з 39 ілюстраціями та схемами з 6-ма підрозділами: 3.1 – цистометричні та тензометричні записи, що демонструють загальновідомі механочутливі відповіді сечового міхура під час наповнення, 3.2 – ПЛР та імуноцитохімія, 3.3 – електрофізіологічні записи, що доводять існування 3-х типів механочутливих відповідей ізольованих гладеньком'язових клітин, 3.4 – ізолювання впливу TREK-1, 3.5 – кальциметричні експерименти з встановленням функціональної наявності Piezo1 та TRPV4 та 3.6 – електрофізіологічні експерименти з дослідженням сигнального зв'язку між Piezo1 та K^+ -провідним каналом.

Згідно з висновком про перевірку на плагіат, проведеною відділом Наукової інформації, інтелектуальної власності та інноваційної діяльності інституту фізіології ім. О.О. Богомольця в роботі засвідчено відсутність порушень академічної доброчесності, тож дисертація відповідає вимогам про порядок присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. №44.

7. Викладення матеріалу дисертації у наукових публікаціях

Результати дисертаційного дослідження опубліковані у чотирьох статтях в фахових журналах: дві статті у журналі «Фізіологічний журнал», що індексується у наукометричній базі Scopus, третя в українському фаховому журналі «Вісник КНУ ім. Тараса Шевченка», та четверта в іноземному фаховому журналі «Neurourology and urodynamics». Результати роботи апробувались на 6-ти фахових конференціях з публікацією тез, з усними доповідями або з постером. Кількість публікацій відповідає теперішнім вимогам для здобуття ступеня доктора філософії з біології.

8. Запитання та зауваження до дисертації

1. Чому для дослідження механочутливості ізольованих клітин використали потік рідини, адже сечовий міхур природно піддається механічним впливам типу розтягнення та тиску? Ви пишете "була сконструйована установка для генерації вузьких потужних струменів зовнішнього розчину, що створюватиме гідродинамічну стимуляцію, що в літературі називають "shear stress". Напряга зсуву визначається як тип напруги, що діє в одній площині з заданим поперечним перерізом матеріалу. Воно виникає внаслідок зсувних сил. Ці сили можуть викликати деформацію або ковзання шарів матеріалу відносно один одного, а напряга зсуву кількісно визначає, наскільки легко відбувається ця деформація. Наскільки точно Ваш пристрій відповідає цьому визначенню.
2. Як Ви визначали величину зсуву напруги? У відомій формулі воно залежить не тільки від об'єму рідини, але і від її в'язкості, ширини шару рідини і має розмірність $\text{дин}\backslash\text{см}^2$.
3. Як результати дисертації з закриттям TRPV4 у м'язовому шарі сечового міхура узгоджуються з літературою, що демонструє залежність спонтанних скорочень з роботою саме цього каналу? Чому за допомогою молекулярних методів досліджували експресію чотирьох механочутливих каналів (Piezo1, Piezo2, TRPV4 та TREK-1), однак на клітинному рівні вивчали можливу роботу лише 3-х (без Piezo2)?
4. Дані про глікокалікс, наприклад, ендотеліальних клітин, накопичені до теперішнього часу, дозволяють зробити висновок, що ендотеліальні клітини не можна розглядати ізольовано без урахування їх глікокаліксу. Що в цьому зв'язку можна сказати про роль глікокаліксу уротелію?
5. Сечовий міхур має здатність виразно довго збільшувати об'єм без приросту тиску. Інакше ми би бігали до туалету кожних 15 хвилин. Раніше це називалося пластичним тонусом. Чи можна вважати, що саме уротелій є головною ланкою пластичного тонусу?
6. Чому для пояснення феномена міогенної ауторегуляції Ви наводите як приклад закон Франка-Старлінга? Для гладких це явище було відкрито набагато раніше (феномен Бейліса).
7. Аплікація L-метіоніну (інгібітора TREK-1), блокувала 90% механоактивованого вихідного струму. Це означає що TREK-1 виконує провідну роль у механочутливості ГМК детрузора. Людина з їжею отримує в день близько 4 г метіоніну, Чи означає це, що фонові

активність ТРЕК зазвичай пригнічена? На той же час, TREK-1 down-regulation асоціюється з гіперактивністю сечового міхура.

8. Гіперактивність сечового міхура у жінок у клімактеричному періоді часто легко купірується після корекції гормонального фону. Чи означає це, що ТРЕК перебувають також під гормональним контролем?

9. Висновок

Загалом, можна заключити, що дисертаційна робота Єльяшова Семена Ігоровича «Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура», подана до захисту на звання доктора філософії є самостійною та завершеною роботою. Висновки роботи є аргументованими та відкривають важливі, фундаментальні, раніше не відомі дані щодо механочутливості сечового міхура. Зміст та оформлення роботи, висновки про відсутність порушень академічної доброчесності та стандартів проведення робіт з експериментальними тваринами говорить про повну відповідність дисертації вимогам про порядок присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 року №44.

Згідно з зазначеним вище, вважаю, що дисертація Єльяшова Семена Ігоровича, виконану на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 «Біологія», за спеціальністю 091 «Біологія» є завершеною та її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю «Біологія».

Офіційний опонент

доктор медичних наук,
професор, завідувач відділу
фармакології клітинних сигнальних
систем та експериментальної терапії
ДУ «Інституту фармакології та
токсикології НАМН України»

А.І. Соловйов

Підпис А.І. Соловйова засвідчує



*заступник директора з
наєркової роботи ДУ, ІФТ НАМН
України*