

**В І Д З И В**  
**офіційного опонента на дисертаційну роботу**  
**ГРИЩЕНКА ОЛЕКСІЯ ВАДИМОВИЧА**

“Впливи мутацій кальційзв’язуючих білків та змін депозалежного входу іонів кальцію на функціонування збудливих та незбудливих клітин”, представленої на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

**Актуальність обраної теми.**

Іони кальцію беруть участь у передачі сигналів від структур плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних структур, забезпечуючи таким чином реакцію клітини на зовнішній стимул. У процесі еволюції молекулярні механізми, що контролюють рівень внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, були сформовані дуже рано; вони необхідні для точного регулювання рівнів як вільного, так і зв’язаного кальцію у цитозолі, а також кількості кальцію, накопиченого у внутрішньоклітинних депо. Ці механізми є універсальними і по суті однакові і у прокариот і еукаріот. Вони включають низьку проникність фосфоліпідних мембран для  $\text{Ca}^{2+}$ , високу внутрішньоклітинну буферну здатність та ефективну систему видалення  $\text{Ca}^{2+}$  за межі клітин. Підтримання кальцієвого гомеостазу досягається за рахунок узгодженого функціонування  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортних систем плазматичної мембрани та внутрішньоклітинних органел та їх взаємної регуляції.

Захворювання серцево-судинної системи посідають перші місця в переліку смертельних захворювань людини в усьому світі. Серед цих захворювань виділяється родинна гіпертрофічна кардіоміопатія (РГК) – одна з найпоширеніших причин раптової смерті. Зокрема, заміна певної амінокислоти у білку тропоніну Т (TnT) підвищує чутливість міофіламентів до  $\text{Ca}^{2+}$  та може викликати шлуночкову аритмію. Механізм виникнення цього феномена досі залишається невідомим.

Гострий панкреатит являє собою такий патологічний стан, при якому спостерігаються значні метаболічні перебудови в різних клітинах підшлункової залози. Дослідження принципів регуляції внутрішньоклітинної концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  та її змін при гострому панкреатиті необхідне як для загального розуміння процесів виникнення патології, так і для знаходження шляхів її лікування. Проте дані про зміни кальцієвого гомеостазу в різних типах клітин екзокринної частки підшлункової залози за фізіологічних та патологічних умов практично відсутні.

Дисертаційна робота О.В. Грищенка присвячена дослідженню вивчення механізмів кальцієвої регуляції незбудливих та збудливих клітин в нормі та патології на прикладі клітин екзокринної системи підшлункової залози та кардіоміоцитів. Теоретичне значення цих досліджень полягає порівняння роботи мембранних та внутрішньоклітинних кальційрегулюючих структур в умовах виникнення патологій (мутації кальційзв'язуючих білків, гіперактивація депозалежного входу  $\text{Ca}^{2+}$  в клітину, індуковане різними чинниками виникнення некрозу ацинарних клітин та розвиток гострого панкреатиту підшлункової залози) істотно допомагають розумінню появи порушень регуляції внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що вони формують нову концепцію розуміння виникнення деяких патологій людини. Ці дані можуть стати основою для розробки високо селективних фармакологічних сполук для лікування гострого панкреатиту та інших патологічних станів, пов'язаних з ушкодженням системи регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, наприклад виникнення аритмії та раптової зупинки серця у пацієнтів з мутаціями у тропоніну-Т, що має значний інтерес для медицини.

#### **Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації.**

Ступінь надійності одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є дуже високим. Ось складові, що гарантують цей високий ступінь:

1. Коректне використання дисертантом сучасних експериментальних методів, які відповідають меті та задачам дослідження. При виконанні роботи були задіяні, зокрема, такі методичні підходи:

- *флуоресцентні методи* (реєстрація змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію);
- *електрофізіологічні методи дослідження;*
- *імуноцитохімічні методи* (морфологію зірчастих клітин і макрофагів вивчали за допомогою лазерного конфокального скануючого мікроскопа);
- *культивування та диференціювання кардіоміоцитів з плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин;*

- *модельовання виникнення некрозу ацинарних клітин та розвитку гострого панкреатиту;*
- *статистичні методи обробки отриманих результатів.*

У методичному розділі також ретельно описані підходи щодо приготування панкреатичних лобул, процедура ізоляції клітин, охарактеризовані розчини, що були використані в експериментах, а також описано технологію навантаження клітин антитілами та флуоресцентними індикаторами.

2. Сукупність змістовного фактичного матеріалу, який подано у експериментальній частині роботи. Викладання власних експериментальних результатів Грищенком О.В. органічно пов'язано з метою та завданнями дисертації, а також із ґрунтовним аналізом літературних даних. Висновки, що були зроблені у роботі, цілком віддзеркалюють фактичні результати, які одержав дисертант.

3. Надійшла попередня апробація накопиченого фактичного матеріалу на різноманітних авторитетних наукових конференціях, симпозіумах та семінарах, а також на сторінках фахових наукових журналів. Основні положення дисертації доповідалися на наукових форумах в Україні та світі. Головні експериментальні результати знайшли віддзеркалення на сторінках авторитетних фахових журналів.

4. Високий науковий потенціал, притаманний дисертантові.

По-перше, на сторінках реферату він вдумливо та всебічно проаналізував велику кількість літературних даних за темою дисертації. Загалом, слід зазначити, що висвітлення Грищенком О.В. питання щодо сучасного стану досліджень у галузі механізмів кальцієвої регуляції клітин детально проаналізований і безперечно відповідає рівню найновіших світових уявлень із цієї. Крім того, виконання такої фундаментальної докторської дисертації вимагало від автора не тільки ґрунтовної теоретичної та методичної підготовки у галузі фізіології, що, відповідно до мети роботи, є цілком зрозумілим, але й, безперечно, знань із мембранології, біофізики та біохімії. І, нарешті, не можу не відзначити чудову обізнаність дисертанта у питаннях фармакології та токсикології.



**Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій,  
сформульованих у дисертації.**

Великий інтерес представляють дослідження спонтанних коливань внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, не пов'язаних з генерацією трансмембранних струмів, що призводять до скорочення кардіоміоцитів на ранніх стадіях розвитку останніх. Продемонстровано, що саме зміни цитозольної кальцієвої буферної ємності призводять до виникнення серцевих аритмій при  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсibiliзуючих мутаціях тропоніну Т. У роботі вперше зареєстровано кальцієвий струм через плазматичну мембрану ацинарних клітин підшлункової залози, що активується вивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулу. Вперше в клітинах у структурі панкреатичних лобул були встановлені зміни кальцієвої сигналізації, що спричиняються брадикініном в концентраціях, які є типовими для панкреатиту. Отримані дані вказують на можливість панкреопротективної дії блокаторів брадикінінового рецептору  $\text{B}_2$ , та продемонстровано, що їх використання запобігає некрозу ацинарних клітин.

Одночасно хочу підкреслити наступне:

- для всього дисертаційного матеріалу властивий високий наочний рівень подання фактичних даних, дисертація проілюстрована 11 рисунками;
- є підстави стверджувати, що дисертант володіє навичками активного застосування математичного апарату для кількісного аналізу власних експериментальних даних та їхньої інтерпретації;
- у тексті роботи має місце змістовне та критичне обговорення дисертантом власних експериментальних результатів. Зокрема, дуже важливим варто вважати намагання автора надати інтегральну картину участі депозалежних каналів у виникненні некрозу ацинарних клітин підшлункової залози.

**Запитання, зауваження та рекомендації з боку опонента.**

Дисертація в цілому написана зрозумілою мовою і більшість проведених експериментів докладно обговорюється. Проте існує кілька моментів, які вимагають роз'яснення:

1. При вивченні механізмів кальцієвої регуляції в клітинах підшлункової залози ви приділили багато часу роботі з лобулами та великими кластерами. А чи не зручніше було б використовувати цілу залозу?

2. Використовуючи конфокальну мікроскопію ви змогли зареєструвати кальцієві транзйенти в нейронах підшлункової залози. Але складається враження, що ви не робили морфологічних дослідів; якщо так, то чому?

3. З вашої роботи видно, що CRAC канали залучені у виникненні більшості патологій, які призводять до некрозу ацинарних клітин підшлункової залози і розвитку гострого панкреатиту. А чи використовуються блокатори цих каналів для лікування або запобігання розвитку гострого панкреатиту?

Ці недоліки не применшують високого наукового рівня роботи. Велика кількість і якість отриманих експериментальних даних свідчать про адекватність і ефективність використаних методів. Висновки дисертанта базуються на великому експериментальному матеріалі і представляються добре обґрунтованими.

#### **Повнота викладу наукових положень, сформульованих в опублікованих працях та у дисертації.**

Результати дисертаційної роботи О.В. Грищенка опубліковано в 16 міжнародних журналах фізіологічного профілю (опублікованих у виданнях I та II квартіля реєстру Міністерства освіти та науки України) та 13 тезах міжнародних конференцій та з'їздів.

Публікації цілком відповідають змісту дисертації. Матеріали роботи також було представлено авторкою на міжнародних наукових конгресах і конференціях.

#### **Важливість для науки і народного господарства одержаних автором дисертації результатів. Рекомендації щодо їхнього використання.**

У науково-теоретичному відношенні результати, що були одержані при виконанні дисертації, віддзеркалюють особистий фундаментальний пріоритетний внесок Грищенка О.В. у розвиток сучасних уявлень щодо молекулярних механізмів кальцієвої регуляції клітин. Дуже суттєвий аспект роботи – її перспективність. Дійсно, хоча вона, у певному розумінні, є закінченою, втім одержані Грищенком О.В. результати орієнтують дослідників на подальший науковий пошук у дуже цікавих напрямках.

Щодо практичного аспекту, то цінність цієї роботи полягає у наступному. По-перше, одержані дані є вкрай важливими для розробки нових фармакологічних сполук для лікування некрозу ацинарних клітин та виникненню гострого

панкреатиту. По-друге, практичним наслідком цієї роботи є і те, що отримані дані про терапевтичні дози галактози дозволять провести клінічне випробування її дії для лікування дитячого гострого лімфобластного лейкозу.

Отже, опонент не має сумнівів, що практичні рекомендації що надані дисертантом, дійсно, являють собою вагомий внесок у сучасні фізіологію.

### **Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.**

Сукупно оцінюючи зміст докторської дисертації Грищенка О.В. необхідно відзначити цільність та завершеність роботи в цілому. В науково-ідеологічному аспекті зміст автореферату є ідентичним основним положенням, викладеним у тексті дисертаційної роботи. Вважаю, що в цілому оформлення автореферату відповідає вимогам, що встановлені МОН України.

Дисертаційна робота Грищенка О.В. є завершеним науковим дослідженням, що вносить істотний вклад у розуміння механізми кальцієвої регуляції в збудливих та незбудливих клітинах в нормі та патології. За своєю актуальністю, методичним і теоретичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною і вірогідністю одержаних експериментальних даних, обґрунтованістю теоретичних та практичних висновків і науковою важливістю для сучасної фізіології дисертація цілком відповідає вимогам п.п.9, 10, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою КМУ № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно з Постановами КМУ №656 від 19.08.2015 р., №1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016 р.), що пред'являються до докторських дисертацій, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Начальник науково-дослідної частини,  
професор Інституту високих технологій  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка,  
доктор біологічних наук, професор



Г.М. Толстанова

