

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

СУХАНОВОЇ ХРИСТИНИ ЮРІЇВНИ

“Механізми кальцієвої сигналізації в артеріальних гладеньком’язових клітинах

при активації іонотропних пуринорецепторів”,

яка була подана до захисту на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.02 – біофізика

Актуальність проблеми

АТФ є одним з важливих котрансмітерів симпатичної нервової системи. Вивільнення АТФ з периваскулярних нервових закінчень разом з іншими нейротрансмітерами - норадреналіном та нейропептидом Y – шляхом активації пуринових P2X рецепторів судин викликає швидку деполяризацію мембрани гладеньком’язових клітин (збуджувальні постсинаптичні потенціали), вхід кальцію через потенціалкеровані кальцієві канали і скорочення судин. Найбільш детально роль пуринових рецепторів з’ясована в vas deferens, де АТФ є основним симпатичним нейротрансмітером. В судинах, навпаки, існує значна варіабельність відносної ролі АТФ і норадреналіну. Крім того, роль АТФ як котрансмітера проявляється по різному в залежності від частоти стимуляції нервових закінчень і від активності потенціалкерованих кальцієвих каналів. Зараз вже не викликає сумніву, що в дії норадреналіну і АТФ на гладенькі м’язи судин існує синергізм, але розкриття детальних механізмів взаємодії між різними сигнальними шляхами при активації пуринових рецепторів потребує подальших досліджень.

З точки зору функції гладеньком’язових клітин, і особливо механізмів контролю тонуусу судин симпатичною нервовою системою, найбільш важливою інтегровною ланкою у взаємодії різних типів рецепторів є внутрішньоклітинна концентрація вільного кальцію – ключового регулятора

скоротливої активності м'язів. Дисертаційна робота присвячена дослідженню мембранних та внутрішньоклітинних механізмів пуринергічної кальцієвої сигналізації, які лежать в основі скоротливої активності гладеньком'язових клітин резистивних артерій. Точне визначення відносного внеску кожного з окремих процесів (вхід кальцію при активації P2X рецепторів, вивільнення кальцію з внутрішньоклітинних депо) в сумарне підвищення концентрації Ca^{2+} в цитозолі клітини, як це було зроблено в цьому дослідженні, дозволяє підійти до питання щодо відносної ролі пуринових рецепторів в скороченні артерій на найбільш фундаментальному рівні, і тому такі дослідження є надзвичайно актуальними.

Робота виконувалась згідно з тематичними планами науково-дослідної роботи Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках трьох науково-дослідних тем: “Механізми збуджувальної та гальмівної дії нейромедіаторів на гладенькі м'язи в нормі та патології” (2008-2010, номер державної реєстрації 0107U005324), “Фармакологічна модуляція механізмів збудження-гальмування гладеньких м'язів у нормі та патології” (2011-2013, номер державної реєстрації 0110U004758) та “Клітинні сигнальні системи в нормі та патології” (2014-2016, номер державної реєстрації 0113U007273).

Наукова новизна отриманих результатів

В дисертаційній роботі за допомогою метода лазерної конфокальної мікроскопії та цілого ряду фармакологічних інструментів (селективних блокаторів потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу, кальцієвої АТФ-ази саркоплазматичного ретикулуму, InsP_3 і ріанодинових рецепторів, фосфоліпази C) були детально досліджені зміни внутрішньоклітинної концентрації вільного кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в ізольованих гладеньком'язових клітинах судин при активації P2X рецепторів селективним агоністом $\alpha\beta$ -меАТФ.

Вперше продемонстровано, що активація P2X рецепторів гладеньких м'язів мезентеріальних артерій викликає підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ шляхом

взаємодії двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які розрізняються за своїм внеском у підвищення загальної внутрішньоклітинної концентрації кальцію; при цьому вхід Ca^{2+} через потенціалкеровані кальцієві канали підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори. Значна увага в роботі приділена і питанням організації внутрішньоклітинних кальцієвих сигналів у часі і просторі.

На особливу увагу заслуговують дані про те, що в пуринергічній сигналізації артеріальних міоцитів задіяні InsP_3 рецептори – це неочікуваний наслідок для активації іонотропних рецепторів. Показано, що коли активуються P2X рецептори і виникає деполяризація мембрани, що в свою чергу призводить до відкривання потенціалкерованих кальцієвих каналів, відбувається подальше значне підсилення кальцієвого сигналу із залученням як InsP_3 , так і ріанодинових рецепторів внутрішньоклітинних кальцієвих депо.

Цікаво, що вивільнення Ca^{2+} через InsP_3 рецептори пов'язане саме з активацією каналів L-типу, що може свідчити про їх нову роль в регуляції тих аспектів кальцієвої сигналізації, які традиційно пов'язували лише з активацією G-білків і фосфоліпази C при активації метаботропних рецепторів. Важливим є і функціональний аспект цього дослідження, адже в експериментах з реєстрацією ізометричного скорочення деендотелізованих сегментів мезентеріальної артерії морської свинки було доведено, що скорочення артерій при дії агоністів P2X рецепторів залежить від обох типів рецепторів – як InsP_3 , так і ріанодинових рецепторів.

Дослідження просторової експресії цих рецепторів за допомогою імунофлуоресцентного аналізу виявило, що InsP_3 рецептори експресовані переважно у субплазмалемальному сакроплазматичному ретикулумі, тоді як ріанодинові рецептори розміщені в його центральній та навколоядерній частинах. Очевидно, що це і є структурною основою диференційного підсилення кальцієвих сигналів при відкриванні іонотропних P2X рецепторів та потенціалкерованих кальцієвих каналів L-типу.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження

Теоретичне значення отриманих результатів полягає в розширенні і поглибленні сучасних уявлень щодо механізмів підвищення концентрації іонів кальцію в гладеньком'язових клітинах артерій при активації P2X рецепторів. Ці процеси є ключовими в регуляції тонуусу судин при активації симпатичної системи, а отже вони відіграють важливу роль в регуляції артеріального тиску. Їх краще розуміння створює теоретичне підґрунтя для цілеспрямованого пошуку нових молекулярних мішеней дії антигіпертензивних препаратів, що має практичне значення.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Використання сучасних експериментальних методів, достатня кількість приведених експериментів, критичний аналіз результатів статистичного аналізу даних, детальний аналіз літературних джерел і узгодження отриманих результатів з існуючими концепціями і висновками інших авторів свідчать про достовірність експериментальних результатів і теоретичних положень дисертаційної роботи. Всі висновки роботи базуються на достатній кількості експериментів в кожній їх серії.

Обсяг проведених досліджень, структура дисертаційної роботи та її відповідність вимогам МОН України

Дисертаційна робота Суханової Х.Ю. представлена за загальноприйнятою формою та згідно вимог МОН України. Роботу викладено на 140 сторінках тексту і проілюстровано 34 рисунками. Наведені діаграми і проілюстровані експериментальні результати дають повне уявлення як про значну складність, так і про об'єм і якість проведених експериментів.

Проведені автором дослідження повністю відповідають меті дисертаційної роботи, а отримані дані дозволяють вирішити поставлені у роботі задачі. Основними частинами роботи є вступ, огляд літератури з досліджуваної проблеми, викладення матеріалів і методів досліджень, результати дослідження, їх обговорення, висновки та списку цитованої літератури, що нараховує 235 джерел.

У вступній частині роботи пояснена актуальність теми дослідження та необхідність кількісного аналізу кальцієвої сигналізації в артеріальних міоцитах для визначення функціональної ролі пуринових P2X рецепторів в регуляції скоротливої активності судин. Відповідно була сформульована загальна мета дослідження та поставлені 4 конкретні задачі для її реалізації. У вступі також пояснюються наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне і практичне значення, а також наводяться повні відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації та публікації результатів дослідження, структури і обсягу дисертаційної роботи.

Огляд літератури починається з розгляду відомих механізмів кальцієвої сигналізації в гладеньком'язових клітинах при активації пуринорецепторів. Далі розглядається будова і функція окремих молекулярних компонентів кальцієвої сигналізації, їх класифікація. Основну увагу при цьому було приділено P2X рецепторам і потенціалкерованим кальцієвим каналам плазматичної мембрани, а також InsP₃ та ріанодиноним рецепторам мембрани саркоплазматичного ретикулуму. Зосередження уваги саме на цих молекулярних компонентах кальцієвої сигналізації є доцільним і обґрунтованим в загальному контексті дослідження. Окремо розглядаються питання, як формуються локальні і глобальні кальцієві сигнали, де автор демонструє своє глибоке розуміння цієї проблематики.

В розділі 2 детально описані об'єкти дослідження, використані методи, умови проведення експериментів і протоколи стимуляції, наведена блок-схема тензометричної установки. Автор приділяє увагу питанням роздільної здатності конфокальних вимірювань, перехресного засвічування/флуоресценції у експериментах з подвійним імунозабарвленням та забарвленням саркоплазматичного ретикулуму, технічним аспектам протоколу сканування,

необхідним контрольним досліддам, деталям статистичної обробки даних тощо. Все це свідчить про високий технічний рівень експериментальної частини роботи.

Розділ 3 містить результати досліджень та їх аналіз. В окремих підрозділах цієї частини визначено внесок активації P2X рецепторів та потенціалкерованих кальцієвих каналів як у загальний $[Ca^{2+}]_i$ сигнал, так і окремо ті його компоненти, що пов'язані з входом та вивільненням кальцію із внутрішньоклітинних депо. Важливо, що робота не обмежується аналізом цих біофізичних аспектів кальцієвої синалізації при активації P2X рецепторів, а завершується аналізом функціональних наслідків (розділ 3.2, скоротлива активність судин), а також просторової організації внутрішньоклітинних кальцієвих депо та можливої диференційної експресії $InsP_3$ і ріанодинових рецепторів в різних його доменах (розділи 3.3. і 3.4). Зокрема показано, що $InsP_3$ рецептори переважно експресовані в зоні безпосередньо під плазматичною мембраною. Загалом, результати роботи відповідають поставленим завданням дослідження.

Обговорення результатів дослідження (розділ 4) є достатньо деталізованим, кваліфікованим, критичним і базується на великій кількості літературних даних, що свідчить про високий теоретичний рівень автора роботи. Слід зазначити, що обговорюються навіть деякі проблеми (наприклад, роль мітохондрій), які безпосередньо не досліджувалися в цій роботі. Одним з головних результатів дослідження є визначення диференційного підсилення кальцієвого сигналу внаслідок входу іонів кальцію із залученням внутрішньоклітинних кальцієвих депо. Показано, що за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} з депо вхід кальцію через потенціалкеровані канали L-типу підсилюється значно сильніше (приблизно 8-кратно) порівняно з P2X-опосередкованим входом Ca^{2+} (3,3-кратно). Таким чином, визначення ролі P2X рецепторів в якості пускового (тригерного) механізму в підвищенні $[Ca^{2+}]_i$ і активації скорочення гладеньких м'язів судин можна вважати одним з основних нових і важливих результатів цього дослідження. Цікавим і важливим є також і встановлення ролі $InsP_3$ рецепторів у підсиленні $[Ca^{2+}]_i$ сигналів при активації іонотропних рецепторів, що може мати загально-біологічне значення.

Автореферат дисертаційної відповідає основним положенням дисертаційної роботи, добре ілюструє її основні результати та розкриває суть роботи. Основні положення роботи доповідались та обговорювались на

наукових міжнародних і національних конференціях, всі результати і висновки повністю викладено в опублікованих працях здобувача, які налічують 13 публікацій, в тому числі 6 статей у фахових наукових журналах. Висновки роботи добре обґрунтовані і цілком відповідають результатам дослідження.

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

1. Для кількісної характеристики і статистичного аналізу кальцієвих сигналів використовувалися як відношення F/F_0 (рис. 3.3, 3.7, 3.8, 3.13, 3.14, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19), так і $\Delta F/F_0$ (рис. 3.5, 3.6, 3.9, 3.11, 3.12, 3.15, 3.20, 3.21, 3.22). Це дві рівноцінні форми представлення результатів, і тому варто пояснити, чому не можна було скористатися лише одним з цих варіантів представлення даних.
2. Більша частина експериментів була проведена на гладеньком'язових клітинах мезентеріальної артерії морської свинки, але в частині дослідів використовувалися резистивні артерії нирок щурів. Цікаво, чи спостерігалися якісь відміни (видоспецифічні, в залежності від типу судин) стосовно P2X сигналізації?
3. Чи проводився функціональний тест на успішну деендотелізацію судин, наприклад з використанням ацетилхоліну?

В цілому високо оцінюючи дисертаційну роботу Суханової Х.Ю., тим не менш варто зробити деякі **зауваження** та висловити **побажання щодо подальшого розвитку цих досліджень**:

1. Відомо, що зв'язок між F/F_0 і концентрацією кальцію є нелінійним. Крім того, частина кальцію, що входить до клітини, зв'язується ендогенними буферними системами клітини. Тому варто при інтерпретації відносних внесків входу та вивільнення кальцію через різні іонні канали і рецептори враховувати дещо якісний характер

- отриманих з використанням флуо-3 даних. Це зауваження в основному стосується розрахунку відносних внесків кожного з шляхів входу кальцію до загального підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у відсотках.
2. Зараз значна увага приділяється дослідженню шляхів депо-залежного входу кальцію, яке виникає за умов спустошення внутрішньоклітинних кальцієвих запасників із залученням TRP каналів і STIM-ORAI білків. Цьому питанню в роботі не приділена належна увага, хоча деякі результати вказують на існування депо-залежного входу кальцію принаймні при дії кофеїну, але ймовірно не при дії CPA (рис. 3.5). Тому в подальших дослідженнях варто більш детально охарактеризувати також і цей додатковий, а за деяких умов і дуже важливий, шлях входу кальцію.
 3. В огляді літератури наводяться схеми, що ілюструють молекулярну будову потенціал-керованих кальцієвих каналів. Варто було б аналогічним чином проілюструвати і будову P2X рецепторів, які в основному досліджуються в цій роботі. Крім того, було б доречним в кінці обговорення надати узагальнювальну схему механізмів кальцієвої сигналізації в артеріальних гладеньком'язових клітинах при активації іонотропних пуринорецепторів.
 4. В роботі зустрічаються деякі неточності в термінології та інтерпретаціях, а також дещо невдалі вирази, наприклад: “внесок механізмів входу”, “суперімпозиція”, “пінхол” тощо. Також бажано було б максимально дотримуватися системи скорочень українською мовою, наприклад ПЗКК замість VGCCs.

Слід наголосити, що висловлені зауваження і побажання до подальших досліджень в цій галузі суттєво не впливають на загалом високу оцінку дисертаційної роботи. В цілому можна сказати, що робота Суханової Х.Ю. є дослідженням в актуальній області і містить низку важливих і нових наукових результатів.

Висновок

Згідно з “Порядком присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об’ємом виконаних досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Суханової Христини Юріївни “Механізми кальцієвої сигналізації в артеріальних гладеньком’язових клітинах при активації іонотропних пуринорецепторів”, 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,
професор і в.о. завідувача кафедри біофізики
ННЦ “Інститут біології” Київського національного
університету імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук Жолос О.В.

Підпис Жолоса О.В. засвідчую
/директор ННЦ “Інститут біології”
Київського національного університету імені Тараса
Шевченка, доктор біологічних наук,
професор Остапченко Л.І.

