

Голові разової спеціалізованої вченої ради ID 6322  
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України  
доктору біологічних наук, професору,  
заступнику директора з наукової роботи,  
завідувачу відділу біофізики іонних каналів  
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця  
НАН України  
Лук'янець Олені Олександрівні

## **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

на дисертаційну роботу  
Єльяшова Семена Ігоровича

«Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових  
клітинах детрузора сечового міхура щура»  
подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії у галузі  
знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

### **Актуальність проблематики дисертаційного дослідження**

Гіперактивний сечовий міхур (ГСМ), який визначається як «невідкладні позиви з або без нетримання сечі, як правило, з частотою та ніктурією» (International Continence Society Standardization of Terminology report, 2002 p.) є поширеним патофізіологічним станом, який значно погіршує якість життя і є значним соціальним і економічним тягарем, адже за різними оцінками від симптомів ГСМ страждає приблизно 17% населення, особливо серед людей старшого віку. Відповідно, негативний економічний вплив є дуже високим, лише в США він

оцінюється в 12,6 мільярдів доларів на рік, що включає як прямі витрати системи охорони здоров'я, так і непрямі витрати, такі як зниження продуктивності праці.

Патогенез ГСМ є дуже складним і різноманітним. Класичні теорії, що пояснюють ГСМ, базуються на порушенні на різних рівнях координації між нервовою системою, уротелієм, детрузором та сфінктерним механізмом. Традиційна терапія ГСМ базується на застосуванні блокаторів мускаринових рецепторів і наразі це перша лінія фармакологічного лікування ГСМ, але такі засоби мають численні побічні ефекти (вони спричиняють сухість у роті, нечіткий зір, тахікардію та ін.) та показують незадовільні клінічні результати. Отже, велика кількість сучасних біомедичних досліджень спрямована на пошук альтернативних мускариновим холіноцепторам потенційно клінічно важливих молекулярних мішеней для розробки нових лікарських препаратів, які могли б дозволити подолати існуючі проблеми традиційної терапії ГСМ із застосуванням антимускаринових препаратів. У цьому контексті дослідження Єльяшова С.І., метою якого було визначення типів механо-активованих відповідей та функціональну роль у цих реакціях TREK-1, Piezo1 та TRPV4 іонних каналів у гладеньком'язових клітинах (ГМК) сечового міхура є надзвичайно актуальним.

Хоча клітинна фізіологія гладенької мускулатури сечового міхура добре розроблена (наприклад, є численні повідомлення про експресію та властивості різних типів іонних каналів і рецепторів, детально досліджено механізми кальцієвої сигналізації), сучасне розуміння механорецептивних властивостей власне ГМК все ще залишається досить обмеженим, зокрема стосовно молекулярних та іонних механізмів трансдукції механічних подразнень.

У дослідженні Єльяшова С.І. головна увага була приділена визначенню ролі TREK-1, Piezo1 та TRPV4 у якості потенційних механочутливих іонних каналів ГМК сечового міхура шурів. Фокус дослідження на цих каналах є обґрунтованим і доцільним, адже у літературі є певні дані щодо їх молекулярної та/або

функціональної експресії у детрузорі, але вони залишаються фрагментарними і досить суперечливими.

### **Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість**

У роботі було проведене комплексне, систематичне дослідження іонних механізмів, що лежать в основі механочутливості ГМК сечового міхура. Отримані дані є повністю новими або такими, що суттєво доповнюють, уточнюють та розвивають сучасні концепції у цій галузі досліджень. Серед найбільш вагомих результатів, які мають наукову новизну, варто відмітити наступні:

- вперше показана гетерогенність популяції ГМК стосовно їх механочутливості, а саме: більшість міоцитів (27 з 49) не були чутливими до гідродинамічної стимуляції, тоді як друга група (13 клітин) генерували характерні для активації неселективних катіонних каналів струми з потенціалом реверсії близько 0 мВ, а у третій групі ГМК (8 клітин) під час гідродинамічної стимуляції виникали вихідні струми при позитивних потенціалах, що характерно для потенціалзалежних  $K^+$  каналів;
- вперше проведене комплексне дослідження функціональної ролі механочутливих Piezo1 каналів ГМК сечового міхура, а отримані результати свідчать про субклітинну локалізацію цих каналів;
- показано, що ефект активації Piezo1 каналів у ГМК сечового міхура реалізується через його взаємодію з АТФ-чутливими ( $K_{ATP}$ ) каналами, що передбачає  $Ca^{2+}$ -залежне інгібування  $K_{ATP}$  каналів. Цікаво відмітити, що активація Piezo1 каналів у бета-клітинах підшлункової залози стимулювала секрецію інсуліну, як було показано у роботі Deivasikamani et al. Scientific Reports 2019 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51518-w>, що також ймовірно спричинялось інгібуванням  $K_{ATP}$  каналів, отже отримані автором результати мають загально біологічне значення;

- доведена диференційна роль калієвих каналів TREK-1 у механочутливості ГМК сечового міхура, але не в усіх клітинах, а лише ймовірно у третій з вищезазначених субпопуляцій;
- була виключена роль механо- і осмочутливого TRPV4 каналу у механочутливості ГМК сечового міхура.

З точки зору практичної значимості результати дослідження Єльяшова С.І. можуть привернути значну увагу у контексті пошуку і валідації новітніх альтернативних молекулярних мішеней у процесі розробки лікарських препаратів для терапії ГСМ. З цієї точки зору найбільш вагомими є отримані автором нові дані щодо ролі Piezo1 каналів у регуляції механочутливості ГМК сечового міхура.

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

Для досягнення поставленої мети дисертаційного дослідження Єльяшов С.І. використав цілий комплекс комплементарних методів, які загалом відповідають найбільш сучасним вимогам у галузі дослідження іонних каналів, тобто проведення дослідження поетапно від характеристики молекулярної експресії методом ПЛР, потім імуноцитохімічної характеристики наявності і клітинної локалізації білків іонних каналів, і нарешті функціональної характеристики іонних каналів (петч клемп реєстрації інтегральних трансмембранних іонних струмів, візуалізація змін концентрації внутрішньоклітинних іонів кальцію методом лазерної конфокальної мікроскопії з використанням кальційчутливих флуоресцентних зондів та тензометричні реєстрації сили скорочення ізольованих гладеньком'язових смужок).

Варто відмітити, що всі використані методи детально описані і проілюстровані, а при проведенні експериментів автором було виконано низку позитивних і негативних контрольних експериментів, що свідчить про його об'єктивний, критичний підхід як до дизайну дослідження і планування експериментів, так і до аналізу і інтерпретації отриманих даних.

Отримані результати були адекватно проаналізовані з використанням відповідних статистичних тестів.

Результати дослідження пройшли належну апробацію шляхом їх представлення на 6 наукових конференціях.

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

Дослідження в межах дисертаційної роботи були виконані у відділі нервово-м'язової фізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України під керівництвом завідуючого відділом – д.б.н., проф., академіка НАН України 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) та грантового проєкту 2020.02/0189 від Національного Фонду Досліджень України «Міогенні механізми механочутливості сечового міхура в нормі і при діабеті 2-го типу» (номер реєстрації: ДР № 0120U104960).

### **Структура, обсяг, зміст та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи**

Обсяг роботи становить 140 сторінок з урахуванням Анотації та Списку використаних джерел. Робота написана за класичною схемою та містить наступні частини: Анотація, Огляд літератури, Матеріали та методи, Результати та їх обговорення, Висновки, Список використаних джерел.

Розділ «Огляд літератури» написаний на 28 сторінках та містить підрозділи, що пояснюють як класичні, так і сучасні уявлення про механочутливість як біологічне явище, будову сечового міхура, особливості механочутливості цього органу, відомі механочутливі канали в м'язовому шарі та існуючі докази щодо їх функціонування. Загалом в роботі опрацьовано 199 робіт актуальної фахової літератури, з яких близько 25% опублікованих за останні 6 років. Огляд літератури свідчить, що її автор є добре обізнаним з проблематикою дослідження, здатен до критичного, системного аналізу і узагальнення наукової літератури.

Результати дисертаційного дослідження опубліковані у 4 статтях у фахових журналах, з них дві статті у Фізіологічному журналі, що індексується у наукометричній базі Scopus, одна – у фаховому журналі України «Вісник КНУ імені Тараса Шевченка») і одна стаття, що опублікована в іноземному фаховому журналі *Neurourology and Urodynamics*, що відноситься до 1-го квартилю - Q1 Scimago Journal & Country Rank. Крім того, результати роботи були апробовані на 6-ти вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

### **Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи**

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження, а саме:

1. Чи проводились розрахунки концентрації вільного  $\text{Ca}^{2+}$  у піпеточних розчинах, які містили суміш 8 мМ EGTA/5 мМ  $\text{CaCl}_2$  або 5 мМ EGTA/1 мМ  $\text{CaCl}_2$  і наскільки ці концентрації відповідали внутрішньоклітинній концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  за фізіологічних умов у стані спокою?
2. З цього витікає більш загальне питання – чому потрібно було фіксувати цитоплазматичну концентрацію  $\text{Ca}^{2+}$ , якщо відомо, що активація механочутливих іонних каналів впливає на мембранний потенціал клітин і рівень внутрішньоклітинного кальцію, і отже є інтегральним компонентом механочутливих скоротливих реакцій гладеньких м'язів? Наприклад, без фіксації внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  було б можливим

реєструвати спонтанні калієві вихідні струми (відомі як STOCs), що виникають при виникненні  $\text{Ca}^{2+}$  «спалахів» ( $\text{Ca}^{2+}$  sparks), які у свою чергу активують близько розташовані кластери  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  каналів, і таким чином отримати додаткову інформацію про вплив механічної стимуляції ГМК на ці процеси.

3. У продовження цього питання, дійсно, у роботі згадується активація  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  каналів навіть при базальному рівні цитозольного кальцію (Рис. 3.4 і с. 78), а експерименти з прямою реєстрацією змін концентрацій цитозольного кальцію в інтактних клітинах з використанням флюоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливого зонду Fluo 3-AM продемонстрували значне зростання концентрації цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  під час натиску на клітину (Рис. 3.19). Отже, на основі цих результатів можливо варто постулювати ще один тип іонного каналу, а саме  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  канал, як такий, що активується при механічній стимуляції детрузора, хоча і опосередковано  $\text{Ca}^{2+}$ -залежним чином? Якщо так, то це може бути домінуючим механізмом зважаючи на високу експресію і провідність  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  каналів у гладеньком'язових клітинах різних типів, у тому числі і у детрузорі (G.V. Petkov, Central role of the BK channel in urinary bladder smooth muscle physiology and pathophysiology. Am J Physiol 2014 doi: 10.1152/ajpregu.00142.2014).
4. Зараз значна увага приділяється питанням локальної кальцієвої сигналізації, тому виникає наступне питання – чи спостерігались  $\text{Ca}^{2+}$  «спалахи» в експериментах, результати яких проілюстровано на Рис. 3.19?
5. Чи немає певного протиріччя між відсутністю GSK1016790A-активованих струмів у ГМК (Рис. 3.22) і наявністю кластерів TRPV4 каналів у мембрані цих клітин відповідно до імуноцитохімічних досліджень (Рис. 3.3B)? Аналогічне питання виникає і стосовно Piezo1, якщо порівнювати Рис. 3.26, Рис. 3.28 і Рис. 3.3A.

6. Розділ 3.2 «Механочутливість гладеньком'язових клітин детрузора»: обговорювана аналогія із законом Франка-Старлінга є цікавою, ілюстративною і свідчить про широку ерудицію автора роботи, але потрібно зауважити, що клітинні механізми, що лежать в основі збільшення скоротливості м'язових клітин при розтягненні тканини у поперечносмугастому серцевому м'язі, де при розтягненні формується більше актин-міозинових поперечних містків, виникає кальцієва сенситизація міофібрил тощо, є суттєво відмінними від гладеньких м'язів.
7. Результати, що наведені у розділі 3.6 «Yoda1-залежне інгібування АТР-чутливих калієвих каналів», передбачають внутрішньоклітинну локалізацію Piezo1, наприклад у мембрані саркоплазматичного ретикулуму, що цілком логічно і ймовірно з огляду на наведені аналогії з іншими типами клітин, але тоді виникає дискусійне питання – яким чином внутрішньоклітинний Piezo1 білок може бути активованим зовнішнім механічним стимулом, таким як натиск на мембрану скляним зондом (Рис. 3.19)?
8. В роботі трапляються неточності термінологічного характеру, наприклад «процедура фіксації струму» або «мікропіпетка для фіксації струму», тоді як реєстрація струмів базується на фіксації напруги; «внесення фармацевтичних засобів», тоді як фармакологічних було б більш правильним терміном.

Висловлені зауваження і запитання носять дискусійний характер, вони не впливають на загалом позитивну оцінку роботи.

### **Висновок офіційного опонента**

Дисертаційна робота Єльяшова Семена Ігоровича «Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура» є самостійно проведеним, оригінальним і завершеним дослідженням, яке спрямовано на вирішення актуальної наукової проблеми і яке містить нові,



науково обґрунтовані дані, положення і висновки, що мають теоретичну і практичну цінність.

У підсумку вважаю, що представлена Єльяшовим Семеном Ігоровичем дисертаційна робота на тему «Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура» відповідає усім вимогам Постанови Кабінету міністрів України №44 від 12 січня 2022 року «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», вимогам щодо опублікування результатів дисертаційного дослідження на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук відповідно до Наказу Міністерства освіти і науки України №1220 від 23 вересня 2019 року ((із змінами, внесеними згідно з Наказами Міністерства освіти і науки №496 від 27 травня 2022 року і №285 від 8 березня 2024 року), а також вимогам Наказу Міністерства освіти і науки України №40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» (із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства освіти і науки №759 від 31 травня 2019 року) щодо оформлення дисертації, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» зі спеціальності 091 «Біологія».

Офіційний опонент  
завідувач кафедри біофізики та нейробіології  
Навчально-наукового центру «Інститут біології та  
медицини» Київського національного  
університету імені Тараса Шевченка  
доктор біологічних наук, професор  
Олександр ЖОЛОС

