

ВІДГУК**офіційного опонента**

на дисертаційну роботу *Суханової Христини Юріївни*

«Механізми кальцієвої сигналізації в артеріальних гладеньком'язових клітинах при активації іонотропних пуринорецепторів»,

представлену на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Дисертаційна робота присвячена вивченню мембранних та внутрішньоклітинних механізмів пуринергічної кальцієвої сигналізації, які приймають участь в регуляції скоротливої активності гладеньком'язових клітин кровоносних артерій та регуляції їхнього тону.

Актуальність теми. Тонус дрібних резистивних артерій регулюється симпатичною нервовою системою. Одним із нейромедіаторів симпатичної нервових закінчень є АТФ. Він викликає скорочення судинних гладеньких м'язів (ГМК) через активацію постсинаптичних P2X пуринорецепторів, які експресуються у сарколеммі. Будучи неселективними іонними каналами, P2X рецептори опосередковують вхід іонізованого кальцію (Ca^{2+}) в середину ГМК, а також наступну активацію потенціал-керованого входу Ca^{2+} та вивільнення Ca^{2+} із внутрішньоклітинних Ca^{2+} депо за механізмом Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} (calcium-induced calcium release, CICR). Однак, роль CICR у механізмах P2X-опосередкованого зростання внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) в судинних ГМК досі залишалася малодослідженою та дуже суперечливою. З іншого боку, досі залишаються недостатньо вивченими в цілому механізми кальцієвої сигналізації, які опосередковується активацією P2X рецепторів в судинних ГМК.

Таким чином, актуальність дисертаційної роботи Суханової Х. Ю. не викликає сумнівів, оскільки детальне вивчення механізмів підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в артеріальних ГМК у відповідь на активацію P2X пуринорецепторів створює важливе підґрунття для ідентифікації потенціальних молекулярних мішеней та

нових фармакологічних інструментів для терапії артеріальної гіпертензії терапії різної етіології.

Дисертаційна робота виконана у науково-дослідній роботі лабораторії молекулярної фармакології та біофізики клітинної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України у рамках 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).

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Дисертаційна робота написана традиційно і викладена на 140 сторінках машинописного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів та чотирьох розділів результатів власних досліджень з їх обговоренням, висновків та списку використаних літературних джерел. Останній складається із 235 посилань. Робота проілюстрована 34 рисунками.

У вступі дисертант переконливо доводить актуальність проведених досліджень, демонструє всебічну обізнаність щодо об'єкта та предмета дисертації, про що свідчить чітке і грамотне формулювання як загальної мети, так і конкретних завдань дослідження.

Огляд літератури представлений глибоким і змістовним аналізом літературних джерел за напрямком дисертаційної роботи. В його розділах дисертант подає дані літератури щодо відомих поглядів на механізми кальцієвої сигналізації в артеріальних ГМК за активації постсинаптичних пуринорецепторів. Представлений огляд свідчить, що P2X на мембрані судинних ГМК викликає складні взаємопов'язані процеси Ca^{2+} -імобілізації, які залучають різноманітні внутрішньоклітинні системи, зокрема активацію входу

позаклітинного Ca^{2+} через канали власне P2X рецепторів та потенціал-керовані Ca^{2+} канали L-типу (L-type voltage-gated calcium channels, L-VGCCs) внаслідок деполяризації сарколеми, вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного ретикулуму (CP) через активацію інозитолтрифосфатних (IP_3Rs) та ріанодинових (RyRs) рецепторів, призводячи до активації скорочення у судинних ГМК. Огляд літератури написано доброю науковою мовою, автор продемонстрував високі теоретичні знання та практичну зрілість, проведений глибокий критичний аналіз сучасних даних літератури відносно досліджуваної проблеми.

В розділі "Матеріали і методи дослідження" дисертант чітко та докладно описує умови проведення експерименту та використані біофізичні, фізіологічні та фармакологічні методи досліджень. Всі використані методи є сучасними, інформативними і адекватними щодо поставлених завдань. Коректна статистична обробка цифрового матеріалу дала автору можливість дійти до формулювання обґрунтованих і достовірних положень і висновків, сформульованих у дисертації.

В експериментах на ізольованих міоцитах та судинних сегментах очеревинної артерії морських свинок та ниркової артерії щурів лінії Вістар автором встановлено істотну кількість нових фактів щодо механізмів кальцієвої сигналізації, які залучені до активації P2X рецепторів ГМК судин.

Наукова новизна отриманих результатів дисертації. Експерименти є високо відтворюваними, а достовірність отриманих результатів не викликає сумніву. Дисертант виконав всі поставлені завдання, які дозволили одержати достатньо результатів для формулювання ґрунтовних висновків. Результати дисертаційної роботи є вагомим внеском у розуміння механізмів регуляції тону судинних гладеньких м'язів.

В дисертаційній роботі за допомогою методів конфокальної мікроскопії, тензометрії, та фіксації мембранного потенціалу «петч-клемп» були детально досліджені зміни у $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та участь L-VGCCs,

сарко/ендолазматичної кальцієвої АТФ-ази, IP_3Rs , $RyRs$, та фосфоліпази C у зростанні $[Ca^{2+}]_i$ при активації P2X рецепторів мембрани ГМК.

В роботі вперше продемонстровано, що активація P2X рецепторів на мембрані ГМК мезентеріальних артерій морських свинок викликає паралельне включення двох Ca^{2+} сигнальних шляхів, які розрізняються за своїм внеском у зростання загальної внутрішньоклітинної $[Ca^{2+}]_i$: вхід Ca^{2+} через L-VGCCs підсилюється за рахунок Ca^{2+} -індукованого вивільнення Ca^{2+} із СР набагато сильніше, ніж вхід Ca^{2+} через P2X рецептори.

Також автором дисертації вперше показано, що, коли в наслідок активації P2X рецепторів в артеріальних міоцитах задіяний вхід Ca^{2+} і за участю P2X рецепторів, і за участю L-VGCCs, подальше підсилення кальцієвого сигналу відбувається за рахунок механізму, що опосередковується як IP_3Rs , так і $RyRs$. Було також встановлено, що IP_3R -опосередковане вивільнення Ca^{2+} із СР переважно пов'язане із активацією L-VGCCs. Залучення вивільнення Ca^{2+} із СР за участю обох типів рецепторів – IP_3Rs та $RyRs$ до генерації фазного скорочення ГМК, що викликане пуринергічною стимуляцією було підтверджено на ізольованих деендотелізованих сегментах мезентеріальної артерії морської свинки.

Також автором дисертаційної роботи показано, що в ізольованих артеріальних ГМК IP_3Rs експресовані переважно у субплазмалемальному СР, в той час як $RyRs$ розміщені на центральних та навколядерних елементах СР. Таким чином, отримані автором результати істотно доповнюють сучасні уявлення про механізми кальцієвої сигналізації, які виникають при активації P2X рецепторів гладеньких м'язів судин.

Наведені в дисертації нові дані розширюють та поглиблюють розуміння клітинних і молекулярних механізмів регуляції скоротливої активності гладеньких м'язів кровоносних судин. З іншого боку, отримані результати окреслюють потенційні фармакологічні мішені для терапії захворювань серцево-судинної системи та інших захворювань, пов'язаних з порушеннями регуляції кровообігу.

Використання сучасних експериментальних методів, достатня кількість приведених експериментів, узгодження отриманих результатів з існуючими експериментальними даними і висновками інших авторів дозволяють говорити про **достовірність теоретичних і експериментальних результатів та обґрунтованість наукових висновків.**

Повнота викладу наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, в опублікованих працях. Результати досліджень, основні положення і висновки дисертації ідентичні змісту автореферату дисертації. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, в тому числі 2 статті у наукових фахових виданнях України і 4 статті у наукових періодичних закордонних виданнях, та в тезах доповідей 7-и наукових міжнародних та національних конференцій та симпозіумів. Опубліковані праці свідчать про повноту викладу наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації.

Оцінюючи в цілому дисертаційну роботу позитивно, слід зазначити, що серйозних недоліків робота не містить, але при прочитанні дисертації виник **ряд дискусійних питань:**

1. Чи здійснювалась перевірка успішної деендотелізації ізольованих судинних препаратів і, якщо так, то яким чином?
2. Чому дослідження були проведені на ГМК саме мезентеріальної артерії морських свинок та ниркової артерій щурів, і чому *різні* судини були обрані у тварин *різних* видів?
3. Який внесок створює P2X-опосередкований механізм активації скорочення судинних ГМК у загальну картину регуляції судинного тонуусу у порівнянні із іншими механізмами активації скорочення ГМК? Наскільки він суттєвий? Оскільки, результати, отримані автором в експериментах на ізольованих деендотелізованих судинних препаратах

показують, що активація P2X рецепторів викликає лише короткочасне нестійке скорочення артеріальних ГМК.

4. Чому експерименти із реєстрації судинного тону були проведені саме на деендотелізованих препаратах артерій? Чи мав автор при цьому на увазі, що на мембрані ендотеліоцитів також експресуються P2X рецептори, активація яких в ендотелії може призводити до протилежного чи синергістичного ефекту на судинний тонус відносно ефекту активації P2X рецепторів у ГМК?

Висловлені в ході рецензування запитання жодною мірою не впливають на загальну позитивну оцінку наукового рівня та змісту дисертаційної роботи, вони не є принциповими, оскільки не ставлять під сумнів сформульовані здобувачем наукові положення та висновки.

Відповідність дисертації вимогам. Оцінюючи роботу в цілому можна сказати, що робота Суханової Х.Ю. є дослідженням в актуальній області і містить низку важливих наукових результатів. Основні положення роботи доповідались та обговорювались на наукових міжнародних і національних конференціях та симпозіумах, всі результати і висновки повністю викладено в опублікованих працях здобувача, які налічують 13 публікацій, в тому числі 6 статей у фахових наукових журналах.

Автореферат адекватно і в повній мірі передає зміст дисертаційної роботи.

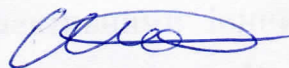
Проведені автором дослідження повністю відповідають меті дисертаційної роботи, а отримані дані дозволяють вирішити поставлені у роботі задачі. Висновки роботи є логічними, аргументованими та базуються на отриманих результатах.

Виходячи з усього вищесказаного вважаю, що дисертаційна робота Суханової Х.Ю. «Механізми кальцієвої сигналізації в артеріальних гладеньком'язових клітинах при активації іонотропних пуринорецепторів» за актуальністю, науковою новизною, теоретичною та практичною цінністю, об'ємом виконаних досліджень та методичним рівнем відповідає вимогам пункту 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор **Суханова Христина Юрійвна** заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент,
старший науковий співробітник
відділу експериментальної терапії

ДУ «Інститут фармакології і токсикології НАМН України»

канд. біол. наук



Кізуб І.В.

Підпис Кізуба І.В. засвідчую:

вчений секретар

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»

канд. фарм. наук, ст. наук. співр



Царенко А.А.