

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію Котик Олени Адамівни «Електрофізіологічні властивості катіонних каналів великої провідності та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів», що подана на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

1. Актуальність теми

Жодний іонний канал сам по собі не здатний забезпечити реалізацію певної функції, якщо він не входить до складу відповідної системи. Таку систему і формують Ca^{2+} -транспортувальні системи ядерної мембрани кардіоміоцитів – Ca^{2+} -помпи (тотожні Ca^{2+} -помпам сарко(ендо)плазматичного ретикулуму), які транспортують катіони Ca^{2+} у перинуклеарний простір, та інозитол-1,4,5-трифосфатчутливі і ріанодинові рецептори, через які реалізується вивільнення депонованого Ca^{2+} . Власне, ця система і забезпечує генерацію особливих локальних Ca^{2+} -хвиль всередині ядра, що має важливе значення для узгодженості фізіологічної активності клітин та експресії певних генів (за рахунок транслокацію факторів транскрипції з цитозолу до ядра).

Тим не менше, ця система була б неефективною без інших іон-транспортних систем. Мембранний потенціал плазматичної мембрани відіграє важливу регуляторну роль стосовно іон-транспортувальних систем плазматичної мембрани. Значення електричного потенціалу крізь внутрішньоклітинні мембрани (за винятком внутрішньої мембрани мітохондрій) є не таким очевидним. Але транспортування іонів крізь мембрани є, здебільшого, електрогенним – тобто, супроводжується генерацією електричного потенціалу і, одночасно, залежить від нього. І не завжди це сприяє реалізації функції цієї іон-транспортувальної системи.

Деколи виникає необхідність компенсувати потік заряду крізь мембрану протилежно спрямованим потоком заряду. Претендентом на цю роль у ядерній мембрані є катіонні канали великої провідності (LCC-каналів), відкриті д.б.н. С. М. Марченком із співавт. у 2005 р. Встановлення електрофізіологічних властивостей цих каналів та з'ясування їхньої фізіологічної ролі – це різнорівневі, але взаємопов'язані етапи дослідження. Тому дисертаційна робота Котик Олени Адамівни, яка спрямована на дослідження електрофізіологічних властивостей LCC-каналів та IP_3 -рецепторів ядерної мембрани кардіоміоцитів, є важливою, сучасною та актуальною.

Актуальність дисертації підтверджується ще й тим, що вона виконана в рамках науково-дослідних проєктів Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного мозку в нормі та патології» (2014–2016, № держреєстрації 0113U007275), «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного та спинного мозку в нормі та патології» (2017–2021, № держреєстрації 0116U004473), «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (2017–2021, № держреєстрації 0116U004470), а також частково за підтримки грантів Президента України для молодих вчених за конкурсними проєктами 17884 та 29460 Державного фонду фундаментальних досліджень (2017 і 2018 рр.).

Нижче, відповідно до вимог МОН України і на підставі вивчення дисертації, автореферату дисертації та праць здобувача, опублікованих за темою дисертації, наводжу своє бачення найсуттєвіших науково-теоретичних та практичних аспектів кандидатської дисертації Котик Олени Адамівни.

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

Про високий ступінь обґрунтованості основних положень дисертації свідчить, насамперед, те, що дослідження проведені на достатній вибірці, цифрові дані були опрацьовані статистично, достовірність різниці між середньоарифметичними показниками перевіряли за t-критерієм Стюдента. У ході дослідження були коректно використані адекватні поставленій меті і завданням дисертації методи – метод виділення ізольованих ядер кардіоміоцитів, patch-clamp у конфігурації *nucleus-attached* і *excised patch*, імуногістохімічний метод, методи статистично-математичного опрацювання. Це досить трудомісткі методи, і їхнє застосування свідчить про високу кваліфікацію дисертанта як дослідника-експериментатора, який здатний вирішувати складні методичні проблеми сучасної електрофізіології.

Об'єктивність результатів досліджень і висновків, наведених у дисертації, підтверджується фактичним матеріалом, який наводиться у експериментальній частині роботи, та ґрунтовністю його аналізу. Суттєво полегшує сприймання фактичного матеріалу і проведення його наукової експертизи ілюстративний матеріал, представлений на 60 (!) рисунках.

Дисертант критично підійшла до обговорення даних наукової літератури і результатів власних досліджень, що дає підстави говорити про її наукову

обізнаність та здатність орієнтуватися у сучасних проблемах електрофізіології та фізіології іонних каналів.

Основні положення дисертації були апробовані на 20-и (!) наукових форумах в Україні та закордоном (Київ-Луцьк, 2018, 2019; Київ, 2016, 2017a, 2017b, 2017c, 2017d, 2018a, 2018b, 2019a, 2019b, 2019c; Львів, 2016a, 2016b, 2017, 2018; Дніпро, 2017; Вінниця, 2016; Göttingen, 2018; Lublin, 2017), що переконує у доцільності таких досліджень і значенні отриманих результатів.

Отже, ступінь обґрунтованості наукових положень і висновків, наведених у рецензованій дисертації, є високим, а Котик Олена Адамівна обізнана з результатами основних наукових досліджень, вміє критично аналізувати наукові факти, інтерпретувати їх, що дозволило їй адекватно вирішити поставлену наукову проблему.

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

Результати аналізу фактичних даних, наведених у кандидатській дисертації Котик Олени Адамівни, їхнього взаємозв'язку і причино-наслідковості переконливо свідчать про те, що вони є достовірними.

Отримані дисертантом наукові результати є новими і пріоритетними. Найбільш цінними, на мій погляд, є такі експериментальні дані.

Вперше зареєстровано струми крізь спонтанно активні канали з різною іонною провідністю (10–340 пСм) ядерної мембрани кардіоміоцитів. Серед них ідентифіковано LCC-канали з провідністю 209 пСм та описано їхні основні електрофізіологічні властивості. Встановлено, що активність LCC-каналів істотно залежить від прикладеного потенціалу. Вони вибірково проникні для одновалентних катіонів (K^+ і Na^+) та практично непроникні для двовалентних катіонів (Ca^{2+}). За позитивних значень мембранного потенціалу (+40 мВ) вони практично весь час були відкритими ($NP_o = 3,11$, вихідний струм), а на негативних значень (-40 мВ) їхня активність суттєво знижувалася ($NP_o = 0,72$, вхідний струм). У роботі перевірено вплив цілої низки агоністів та антагоністів Н-холінорецепторів й отрут змії на функціональну активність LCC-каналів. Ідентифіковано IP_3 -рецептори ядерної мембрани кардіоміоцитів з провідністю 384 пСм і різною чутливістю до Ca^{2+} . Встановлено, що одна популяція IP_3 -рецепторів внутрішньої ядерної мембрани кардіоміоцитів характеризується класичною дзвоноподібною залежністю ймовірності перебування каналу у

відкритому стані від концентрації Ca^{2+} (повне інгібування за 1 мкмоль/л), а для іншої популяції інгібування починається лише за 10 мкмоль/л Ca^{2+} .

Отримані результати безсумнівно є важливими для подальших досліджень особливостей кальцієвої сигналізації у ядрі кардіоміоцитів, а тому є цінними для електрофізіологів, клітинних фізіологів, біофізиків, кардіологів тощо.

4. Запитання, зауваження та рекомендації з боку опонента

Вважаючи, що кандидатська дисертація Котик Олени Адамівни має високий теоретичний і методичний рівень, я хочу зробити деякі зауваження і задати декілька дискусійних питань дисертанту стосовно оформлення дисертації та автореферату, фактичного матеріалу та інтерпретації отриманих результатів:

1. Текст дисертації та автореферату написаний гарною мовою, послідовний, логічний і одночасно інформативний. Але містить невелику кількість помилок редакційного характеру та недоречне використання деяких термінів, на зразок, «синтез IP_3 і циклічного діацилгліцеролу (DAG)» (с. 27), «боросилікатних скляних капілярів з філаментом, внутрішній діаметр 1,5 мм та зовнішній – 0,86 мм» (с. 55), «антитіла є синтетичним пептидом» (с. 57), «виділяють з яду змії *Bungarus multicinctus*» (с. 68) тощо. Окремо потрібно зробити зауваження стосовно (не) використання авторкою таких знаків пунктуації, як коми.
2. Формула (2.3) у дисертації (с. 58) є неповною та містить помилки в описі деяких компонент.
3. Крім наведення типових вольт-амперних характеристик струму крізь LCC-канали (рис. 3.3, 3.4, 3.5) та IP_3 -рецептори (рис. 3.39) ядерної мембрани кардіоміоцитів варто було б графічно представити залежність ймовірності перебування каналів у відкритому стані від значення мембранного потенціалу. Ці залежності матимуть чи не більше значення для обґрунтування фізіологічної ролі цих каналів та встановлення зв'язку між ними.
4. Чому важливим є той факт (с. 121 дисертації і с. 15 автореферату із посиланням на Федоренко, Марченко, 2012), що LCC-канали та IP_3 -рецептори мають однакову потенціалзалежність? Чи не викликає у вас якихось застережень, що за негативних значень потенціалу через IP_3 -рецептори реєструється струм вхідного напрямку?
5. Що з протестованих агоністів/антагоністів Н-холінорецепторів і/чи отрут змій може бути найкращим інструментом (зважаючи на діючу

концентрацію та вже відому специфічність стосовно інших іон-транспортних систем тощо) для дослідження фізіологічної ролі LCC-каналів ядерної мембрани кардіоміоцитів? Чому?

Проте ці зауваження і питання не мають принципового значення і суттєво не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи.

5. Повнота викладу наукових положень, висновків і рекомендацій, які сформульовані у дисертації, в опублікованих працях

Наукові положення, висновки і рекомендації повністю висвітлені у 25 наукових публікаціях, в тому числі у 5 статтях (з них усі 5 – рекомендовані МОН України), у т.ч. 3 статті у Фізіологічному журналі і 1 стаття у Нейрофізіології – у виданнях, що індексуються Scopus, і є свідченням високого рівня отриманих результатів.

6. Щодо відповідності встановленим вимогам

Дисертаційне дослідження Котик Олени Адамівни є завершеною, самостійно виконаною науковою працею, в якій отримано нові науково-обґрунтовані результати, що в сукупності вирішують конкретну наукову задачу і є важливими для електрофізіології та клітинної біології. Науковий зміст автореферату відповідає науковим положенням дисертації.

7. Важливість для науки і народного господарства одержаних автором результатів. Рекомендації щодо їхнього використання

У науково-теоретичному відношенні результати дисертаційної роботи Котик Олени Адамівни є важливими, оскільки отримано принципово нові дані щодо наявності та властивостей катіонних каналів великої провідності та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів у ядерній мембрані кардіоміоцитів. Це має важливе значення для подальших досліджень особливостей кальцієвої сигналізації у ядрі кардіоміоцитів і, відтак, для встановлення механізму зв'язку між швидкою, але нетривалою зміною активності кардіоміоцитів (скороченням) та повільною довготривалою адаптацією цих клітин, в основі якої лежить, очевидно, зміна рівня експресії певних генів. Крім того, вважаю за доцільне використання основних положень дисертації під час читання лекцій із нормативних курсів «Фізіологія людини і тварин» і та «Біофізика», а також таких спеціальних курсів закладів вищої освіти, як «Електрофізіологія», «Клітинна

фізіологія», «Фізіологія іонних каналів», «Електробіофізика», «Кардіологія» тощо.

8. Висновок

Кандидатська дисертація Котик Олени Адамівни є актуальним і фундаментальним дослідженням у галузі електрофізіології та клітинної біології. У ході виконання цієї роботи були отримані вагомі наукові результати щодо ідентифікації та властивостей катіонних каналів великої провідності та інозитол-1,4,5-трифосфатних рецепторів у ядерній мембрані кардіоміоцитів. Ці результати є фундаментальними і важливими. За рівнем наукової новизни ці результати відповідають вимогам, що висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук. Тема роботи, об'єкт та предмет дослідження, її зміст, а також положення та висновки відповідають паспорту спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. У дисертаційній роботі містяться раніше незахищені наукові положення.


Отже, дисертаційна робота відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р., № 567 (із змінами), які висуваються до кандидатських дисертацій, а її автор Котик Олена Адамівна повністю заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент –

завідувач кафедри фізіології людини і тварин

Львівського національного університету імені Івана Франка

доктор біологічних наук, професор

 В.В. Манько

07.04.2020 р.

Підпис професора Манька В.В. засвідчую.

Вчений секретар

Львівського національного університету

імені Івана Франка, доцент

О.С. Грабовецька