

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”, представлена на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Актуальність обраної теми.

Внутрішньоклітинний кальцій є один з найбільш універсальних вторинних посередників, який бере участь у передачі сигналу від структур плазматичної мембрани до внутрішньоклітинних структур, які забезпечують реакцію клітини на зовнішні подразники. Іони кальцію задіяні в цілому ряді важливих клітинних процесів, таких як секреція, проліферація, клітинна збудливість, синаптична передача, скорочення і інші.

Дисертаційна робота О.В. Грищенко присвячена дослідженню 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 в тому, що вони істотно допомагають розумінню механізмів регулювання та підтримування необхідного рівня внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Досліджені канали депозалежного входу іонів кальцію, впливи мутацій кальційзв’язуючих білків цитоплазми на буферну ємність кардіоміоцитів, та білка саркоплазматичного ретикулуму (кальсеквестрину) на вхід іонів кальцію до клітини. Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що вони формують нову концепцію розуміння виникнення деяких патологій людини. Ці дані можуть стати основою для розробки високоселективних 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 тропоніні-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 досить 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;*
- *електрофізіологічні методи дослідження;*
- *імуноцитохімічні методи;*
- *культивування та диференціювання стовбурових клітин;*
- *моделювання 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 завантаження 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'язане з метою та завданнями дисертації. Висновки, що були зроблені у роботі, цілком віддзеркалюють фактичні результати, які отримав дисертант.

3. Надійна 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 у 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. У комплексі ж у мене склалося таке враження: аналітичний рівень висвітлення Грищенком О.В. питання щодо сучасного стану досліджень у галузі механізмів кальцієвої регуляції клітин безперечно відповідає рівню найновіших світових уявлень із цієї проблеми.

По-друге, виконання докторської дисертації такого рівня вимагало від автора не тільки ґрунтовної теоретичної та методичної підготовки у галузі фізіології, що,

відповідно до мети роботи, є цілком зрозумілим, але й, безперечно, багато знань із мембранології, біофізики та біохімії.

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

Використовуючи сучасні методичні підходи О.В. Грищенком вперше виявлено пряму кореляцію між рівнем буферної ємності та шлуночковою аритмією при мутаціях тропоніну, які підвищують чутливість міофіламентів до іонів кальцію. Великий інтерес представляють дослідження спонтанних коливань внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, не пов'язаних з генерацією трансмембранних струмів, які призводять до скорочення кардіоміоцитів на їх ранніх стадіях розвитку. У роботі вперше зареєстрований кальцієвий струм через плазматичну мембрану ацинарних клітин підшлункової залози, який активується вивільненням Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу. Вперше в клітинах у структурі панкреатичних лобул були встановлені зміни кальцієвої сигналізації, що спричиняються брадикініном у концентраціях, типових для панкреатиту. Отримані дані вказують на можливість панкреопротективної дії блокаторів брадикінінового рецептору 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;
- 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 впливу росту чутливості міофіламентів на збільшення буферної кальцієвої здатності клітин, адже саме цим можуть бути пояснені зміни електричної та скорочувальної активності “мутантних” кардіоміоцитів.

Запитання, зауваження та рекомендації з боку опонента.

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

1. Цікаве питання, яке не було, на жаль, детально обговорене: чи впливають на електричні та скорочувальні характеристики кардіоміоцитів реагенти, які викликали збільшення чутливості міофіламентів до кальцію? Або це прямий вплив на регуляторні та скоротливі білки?
2. У роботі описані механізми виникнення серцевих патологій, які зумовлені мутаціями у тропоніні. А чи дозволяють, на Ваш погляд, ці факти вийти на перші етапи доклінічних досліджень, тобто зробити крок до розробки ліків для людей, що мають подібні мутовані білки?
3. Фармакологи давно активно ведуть пошук так званих справжніх кардіотоників - кальцієвих сенситайзерів. Виходячи з Ваших даних, чи можна припустити, що цим сполукам притаманні потенційно небажані проаритмічні властивості?
4. Серед моделей гострого панкреатиту є викликані введенням L-аргініну, алкоголю, пептиду церуліну але я не зустрічав раніше моделі індукованої цитостатиком аспарагіназою. Чи є ця модель на теперішній час загальноприйнятою?
5. Добре відомо, що в кардіоміоцитах вхід Ca^{2+} ззовні опосередковується більшою мірою (майже повністю) через кальцієві канали L-типу. Чому ви приділили мало уваги вивченню саме цих типів каналів, натомість зосередившись майже повністю на вивченні депозалежних іонних каналів?
6. Відсутня інформація щодо відносної кількості різних типів клітин у підшлунковій залозі, а саме зірчастих та імунних клітин і нейронів.
7. При статистичному аналізі використовувався t-тест Ст'юдента, але не вказано, чи проводилася попередньо перевірка на нормальність розподілу.
8. При зазначенні концентрації кальцію та хелатора у розчині бажано, для зручності читача, одночасно вказувати і концентрацію вільного кальцію.

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 та виглядають гарно 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 були представлені автором 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, які були отримані 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 послідовників на подальший науковий пошук у цих дуже цікавих напрямках.

Щодо практичного аспекту, то цінність цієї роботи полягає у наступному. По-перше, одержані дані дозволяють оцінити, які саме механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у клітинах різних типів (як електробудливих, так і незбудливих) пошкоджуються за розвитку низки патологій. По-друге, отримані дані продемонстрували, що саме зміни цитозольної кальцієвої буферної ємності призводять до виникнення серцевих аритмій при Ca^{2+} -сенсibiliзуючих мутаціях тропоніну Т. Такі зміни у кальцієвій регуляції кардіоміоцитів можуть бути основою для модуляції серцевих скорочень у пацієнтів, що мають мутацію тропоніну TnT-I79N і в підсумку призводити до синдрому раптової зупинки серця.

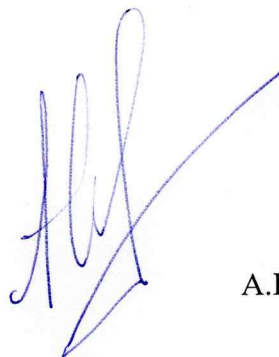
Отже, опонент не має сумнівів, що надані дисертантом практичні рекомендації дійсно являють собою вагомий внесок у сучасну фізіологію.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам.

Сукупно оцінюючи зміст докторської дисертації Грищенка О.В. необхідно відзначити цільність та завершеність роботи в цілому. У науково-ідеологічному аспекті зміст автореферату є ідентичним основним положенням, викладеним у тексті дисертаційної роботи. Вважаю, що загалом оформлення автореферату та дисертації відповідає всім вимогам, встановленим ВАК 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 ВАК України, що пред'являються до докторських дисертацій біологічного профілю, а її автор заслуговує присудження наукового ступеню доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Зав. відділу фармакології клітинних
сигнальних систем та експериментальної терапії
ДУ «Інститут фармакології та токсикології
НАМН України»,
доктор медичних наук, професор



А.І. Соловійов

Підпис проф. А.І. Соловійова підтверджую:

Вчений секретар ДУ
«Інститут фармакології та токсикології
НАМН України»
к.б.н



А.А. Царенко

05.06.2020