

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Директор Інституту фізіології
ім. О.О. Богомольця НАН України
академік НАН України
Микола ВСЕЛОВСЬКИЙ

8 квітня 2024 р.

ВИСНОВОК

Про наукову новизну та практичне значення результатів докторської дисертації Шкриля В'ячеслава Михайловича на тему: «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах» поданої на здобуття ступеня доктора наук в галузі знань 03 Біологічні науки за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

Фаховий семінар відділу біофізики іонних каналів із залученням членів Вченої ради, а також співробітників інших відділів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця проведено згідно Протоколу № 1 від 26 березня 2024р.

Актуальність обраної теми.

Ріанодинові рецептори (RyRs) є важливими компонентами кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах. Вони здійснюють вивільнення кальцію з саркоплазматичного ретикулуму (СР) в цитоплазму. Іони кальцію (Ca^{2+}) є одним із головних вторинних посередників чисельних метаболічних реакцій і активатором багатьох ферментів, контролюють багато фізіологічних шляхів, а в збудливих клітинах – процеси збудження, м'язового скорочення, вивільнення медіаторів, синаптичної пластичності, секреції, а також процеси запліднення, транскрипції генів та апоптозу тощо (Pozzan et al., 1994, Berridge et al., 2000, Eisner et al., 2023). Процес вивільнення кальцію з депо має велике значення для функціонування м'язів і нервової системи.

На субклітинному рівні активність RyRs реєструється як кальцієві спалахи, які розглядаються як локальні зміни концентрації кальцію під час його вивільнення з СР внаслідок одночасного відкриття декількох RyRs. Динаміка Ca^{2+} спалахів є важливою для кальцієвої сигналізації. Розуміння ролі як спалахів, так і роботи залучених RyRs на рівні регуляції та динаміки кальцієвого сигналу у нормі та патології слугує основою для з'ясування функціональних змін Ca^{2+} сигналу на клітинному або субклітинному рівнях.

Ріанодинові рецептори відіграють дуже важливу функціональну роль. Дійсно, нокаут RyR1 та RyR2 (у гомозигот) є летальним ще на ембріональному рівні, нокаут RyR2, хоча і не є летальним, призводить до істотних змін соціальної поведінки та локомоторної активності тварин. Оскільки ріанодинові рецептори відіграють важливу роль в опосередкуванні та регуляції кальцієвих

сигналів та водночас залишається багато нез'ясованих питань щодо клітинних механізмів цих процесів, тема роботи є дуже актуальною.

Також актуальність досліджень ріанодинових рецепторів в кальцієвій сигналізації полягає в тому, що вони є потенційними мішенями для створення нових медичних препаратів для лікування різних захворювань, пов'язаних з порушенням кальцієвої концентрації в клітинах. Наприклад, деякі хвороби м'язів, такі як дистрофія м'язових волокон, аритмії серця, а також нейродегенеративні захворювання, можуть бути пов'язані зі зміною функціональності RyRs.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана згідно плану науково-дослідної тематики відділу біофізики іонних каналів Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та інших програм, що виконуються відділом (номер державної реєстрації 0118U007344, 0116U004470 та 0120U001281). Частина роботи була виконана в рамках програм міжнародного співробітництва "Клітинні системи в нормі на патології" в Університеті Медицини та Стоматології Нью-Джерсі, США та Медичному Центрі Університету Раш, Чикаго, США.

Наукова новизна одержаних результатів.

Здобувач зробив внесок у розв'язання важливої наукової проблеми щодо формування кальцієвого сигналу за рахунок ріанодинових рецепторів в м'язових і нервових клітинах. Його дослідження включало модулювання цих рецепторів за допомогою активних форм кисню та NADP(H)-оксидазою, взаємодію з мітохондріальним кальцієм та NADH сигналом, а також рівень електричної стимуляції.

Використання високошвидкісної конфокальної мікроскопії для візуалізації динаміки Ca^{2+} в серцевих міоцитах дозволило виявити часозалежність збільшення Ca^{2+} , який входить у клітину через L-тип кальцієвого каналу та вивільнюється з CP при відкритті RyRs з можливістю розділення у часі і просторі окремих центрів вивільнення кальцію як у клітинах передсердя, так і шлуночків міокарда. Прямо показано, що в міоцитах передсердь зміна рефракторної кінетики вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму від стимулу до стимулу є ключовим причинним механізмом виникнення Ca^{2+} -альтернацій, як важливий механізм утворення серцевої аритмії.

Важливим досягненням роботи є реєстрація спалахів Ca^{2+} , які були зареєстровані у місцях його вивільнення з CP, та з'ясування їх властивостей. Було встановлено, що розподіл амплітуд кальцієвих спалахів є модальним. Використання тривимірного конфокального сканування в часі дозволило розрахувати потік вивільнення при спалаху Ca^{2+} з великою достовірністю та обчислити струм іонів Ca^{2+} , який при цьому генерується. Було виявлено, що цей струм становив 11 пА, що відповідає відкриттю 20 каналів RyRs при спалаху Ca^{2+} . Цей результат переконливо підтверджує залучення великої кількості рецепторів для формування спалаху Ca^{2+} .

Було обґрунтовано показано, що субпопуляція мітохондрій знаходиться в тісній функціональній і, ймовірно, структурній близькості до СР, що призводить до утворення субклітинних мікродоменів, в яких Ca^{2+} має переважний доступ до зближених органел.

Розкриті нові аспекти регуляції мітохондріального окислювального-відновлювального стану щодо регуляції вивільнення Ca^{2+} із саркоплазматичного кальцієвого депо на прикладі активності групи RyRs в скелетних м'язах. Встановлено, що активні форми кисню (ROS) сприяють аномальній активності Ca^{2+} -спалахів у скелетних м'язах ссавців, що піддаються осмотичному стресу. ROS-залежні Ca^{2+} спалахи є складовою частиною адаптивних/неадаптивних реакцій м'язів у різних патологічних станах, таких як ексцентричне розтягнення, осмотичні зміни під час ішемії та реперфузії, а також при деяких м'язових захворюваннях. Проведені дослідження показали, що надмірне утворення ROS та одночасна активація аномальних сигналів Ca^{2+} посилюють один одного, що врешті-решт призводить до замкненого кола пошкоджуючих подій, які можуть сприяти підвищенню чутливості до стресу в дистрофічних скелетних м'язах.

Показано здатність скелетних м'язів амфібій до активації RyRs за рахунок кальцію. На противагу цьому, м'язові волокна миші не здатні активувати RyR1 кальцієм. Тільки при фармакологічній сенсibiliзації цих рецепторів існує можливість активації їх за рахунок CICR.

Отримані нові дані про роль RyRs у внутрішньоклітинній динаміці кальцієвих сигналів в пірамідальних нейронах гіпокампу щурів, індукованих деполяризацією або електричною стимуляцією, з подальшою зміною концентрації Ca^{2+} в різних ділянках пірамідних нейронів гіпокампу. Зростання концентрації вільного Ca^{2+} є асинхронним і затримується в центральній ділянці порівняно з примембранними ділянками або ділянками дендритного дерева, де спостерігається швидший розвиток Ca^{2+} сигналу. Короткочасна електрична стимуляція (1 с) була недостатньою для посилення Ca^{2+} сигналу через CICR, але виявилася ефективною при тривалому збудженні (6 с), що викликало вивільнення кальцію з ER-сховища. Тривалість стимуляції дозволила активувати 30% пікової амплітуди Ca^{2+} транзйенту, що відповідає RyRs-опосередкованому вивільненню кальцію.

Результати дослідження є внеском у комплексне розуміння рiанодин рецептор-опосередкованої кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах у нормі та патології.

Більшість результатів роботи опубліковані у високореєтингових міжнародних фахових наукових журналах. Це означає, що результати є важливими, оригінальними, дуже пильно та прискіпливо рецензувалися. Новизна отриманих результатів також підтверджується високою цитованістю робіт Шкриля В. М.. Зокрема, згідно із Google Scholar, за темою дисертації у

Шкриля В. М. є що найменше 4 роботи, кожна із яких процитована 100 та більше разів.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів.

Данна робота містить важливі положення та нові обґрунтовані результати у галузі науки – біологія, одержані здобувачем особисто, та має практичну та теоретичну цінність.

Представлена робота є важливою для біофізики, оскільки розширює сучасні уявлення щодо функції ріанодинових рецепторів у модуляції клітинної концентрації кальцію в м'язових і нервових клітинах, як на рівні окремих органел: саркоплазматичного ретикулуму та мітохондрії, так і на рівні субклітинних доменів та центрів вивільнення кальцію.

Запропоновано методичні підходи для вивчення біофізичних процесів збудливих клітин, базуючись на швидкісній конфокальній візуалізації для дослідження Ca^{2+} сигналів з часовою роздільною здатністю, подібною до методу петч-клемп, але у менш інвазивний спосіб, з можливістю розділення по всій клітині.

Порушення регуляції RyRs є ключовим фактором у виникненні різних захворювань. Тому розуміння процесів, що впливають на активність RyRs, є важливим для розробки терапевтичних підходів. Результати цього дослідження є значним внеском у розвиток нашого розуміння механізмів, що лежать в основі альтернуючого серцебиття. Вони відкривають нові перспективи для розробки ефективних стратегій лікування аритмій.

Вперше запропоновано методичні підходи дослідження RyRs, визначення потоку вивільнення кальцію з СР з великою достовірністю, ґрунтовані на тривимірному конфокальному скануванні флуоресценції Ca^{2+} спалахів у місці вивільнення з СР. Що дає можливість використати її для фармакологічних досліджень ріанодинових рецепторів.

Був запропонований новий метод просторової, складної, дифракційно-обмеженої фотоактивації та фотознебарвлення в живих клітинах. Така методика дозволяє локально активувати окремі сайти вивільнення кальцію або групу RyRs каналів у живих клітинах.

Також була адаптована та модифікована формула Грінкевича при двох хвильовому методі збудження флуоресцентного барвника. Ця модифікація необхідна для визначення концентрації кальцію при двох хвильовому методі збудження флуоресцентного барвника і повинна використовуватися в подальших дослідженнях. За цією роботою було отримано патент на корисну модель.

Представлені результати мають загальне біологічне значення і поглиблюють наше розуміння кальцієвої сигналізації в м'язових і нервових клітинах. З практичної точки зору, отримані дані є основою для подальшого вивчення молекулярних механізмів процесу спряження збудження і скорочення

як у кардіоміоцитах, так і в скелетних м'язових волокнах, а також розкривають розуміння ролі кальцій-залежних функцій у нервових клітинах.

Особистий внесок здобувача в отриманні наукових результатів.

Дисертація є завершеним комплексним дослідженням, яке присвячене вивченню впливу ріанодинових рецепторів на формування кальцієвого сигналу в м'язових та нервових клітинах, виконаною здобувачем самостійно.

У процесі дослідження автором безпосередньо було здійснено обрання теми дисертації, предмету та методів дослідження, постановку й обґрунтування теми, вирішення основних аналітичних та експериментальних завдань. Автором проведено науковий пошук та детальний аналіз наявних даних літератури щодо регуляції внутрішньоклітинного кальцію за рахунок ріанодинових рецепторів. При проведенні досліджень здобувачем особисто виконано основну частину експериментальної роботи, аналіз отриманих результатів, їх наукову інтерпретацію та узагальнення, формулювання висновків та написання статей. Деякі експерименти були проведені зі співавторами опублікованих робіт. Автор щиро вдячний проф. Н. Широкова Школи Медицини Нью-Джерсі Університету Медицини та Стоматології Нью-Джерсі (Ньюарк, США), проф. Л. Блатеру та проф. Е. Ріусу Медичного центру Університету РАШ (Чикаго, США) за плідну співпрацю. Частина експериментів була проведена у співпраці з д.б.н. Оленою Ісаєвою, PhD Figueroa L., PhD Maxwell J.T., PhD Domeier T.L., PhD Martins A.S., к.б.н. Наталією Розумною та к.б.н. Вітою Ганжою. Вони є співавторами відповідних статей.

Повнота викладення матеріалів дисертації в публікаціях.

Дисертація представлена як доповідь за сукупністю наукових статей. Автор має 11 статей у виданнях, віднесених до першого квартилю (Q1), одну статтю віднесено до другого квартилю (Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports.

1. **SHKRYL, V. M.** 2022. The spatio-temporal properties of calcium transients in hippocampal pyramidal neurons in vitro. *Front Cell Neurosci*, 16, 1054950.
2. **SHKRYL, V. M.** 2020. Error correction due to background subtraction in ratiometric calcium measurements with CCD camera. *Heliyon*, 6, e04180.
3. FIGUEROA, L., **SHKRYL, V. M.**, BLATTER, L. A. & RÍOS, E. 2013. Using two dyes with the same fluorophore to monitor cellular calcium concentration in an extended range. *PLoS One*, 8, e55778.
4. **SHKRYL, V. M.** & BLATTER, L. A. 2013. Ca(2+) release events in cardiac myocytes up close: insights from fast confocal imaging. *PLoS One*, 8, e61525.
5. **SHKRYL, V. M.**, BLATTER, L. A. & RÍOS, E. 2012. Properties of Ca²⁺ sparks revealed by four-dimensional confocal imaging of cardiac muscle. *J Gen Physiol*, 139, 189-207.
6. **SHKRYL, V. M.**, MAXWELL, J. T., DOMEIER, T. L. & BLATTER, L. A. 2012. Refractoriness of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release determines Ca²⁺ alternans in atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H2310-20.

7. **SHKRYL, V. M.**, MAXWELL, J. T. & BLATTER, L. A. 2012. A novel method for spatially complex diffraction-limited photoactivation and photobleaching in living cells. *J Physiol*, 590, 1093-1100.
8. FIGUEROA, L., **SHKRYL, V. M.**, ZHOU, J., MANNO, C., MOMOTAKE, A., BRUM, G., BLATTER, L. A., ELLIS-DAVIES, G. C. & RÍOS, E. 2012. Synthetic localized calcium transients directly probe signalling mechanisms in skeletal muscle. *J Physiol*, 590, 1389-411.
9. **SHKRYL, V. M.**, MARTINS, A. S., ULLRICH, N. D., NOWYCKY, M. C., NIGGLI, E. & SHIROKOVA, N. 2009. Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch*, 458, 915-28.
10. MARTINS, A. S. *, **SHKRYL, V. M. ***, NOWYCKY, M. C. & SHIROKOVA, N. 2008. Reactive oxygen species contribute to Ca²⁺ signals produced by osmotic stress in mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*, 586, 197-210. * перший автор
11. **SHKRYL, V. M.** & SHIROKOVA, N. 2006. Transfer and tunneling of Ca²⁺ from sarcoplasmic reticulum to mitochondria in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 281, 1547-54.
12. ISAEVA, E. V.* , **SHKRYL, V. M.*** & SHIROKOVA, N. 2005. Mitochondrial redox state and Ca²⁺ sparks in permeabilized mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, 565, 855-72. * перший автор

Наукові публікації відповідають п.8 Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук (Постанова Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197 із змінами, внесеними згідно з Постановою КМ № 502 від 19.05.2023) та наказу МОН України № 1220 від 23.09.2019 р. (із змінами, внесеними згідно з Наказом МОН № 496 від 27.05.2022) «Про опублікування результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора і кандидата наук».

Апробація результатів дослідження.

Основні положення дисертаційної роботи були представлені для обговорення на семінарах Інституту ім. О.О. Богомольця НАН України, а також на наступних міжнародних симпозіумах і з'їздах: Американського Біофізичного Товариства (Лонг Біч, 2005, Солт Лейк Сіті, 2006, Балтімор 2007, Лонг Біч 2008, Бостон, 2009, Сан Франциско, 2010, Балтімор 2011, Сан Дієго, 2012); Всеукраїнської конференції Товариства Нейронаук (Київ, 2017, 2022 Україна); Українського Фізіологічного Товариства (Київ, 2019, 2021, Україна) та XI з'їзд Українського біофізичного товариства (Київ, 2023 Україна).

Відомості щодо проведення біоетичної експертизи.

Витяг КОМІТЕТУ З БІОМЕДИЧНОЇ ЕТИКИ Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця № 1/24 від 29 лютого 2024: дисертаційна робота «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових

клітинах» докторанта Шкриля В. М. відповідає принципам Комітету з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Дисертація виконана з дотриманням всіх вимог біомедичної етики.

Відомості щодо перевірки рукопису дисертації на академічний плагіат.


На основі автоматизованої перевірки рукопису Шкриль В. М. «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах» за допомогою системи UNICHECK (ID перевірки: 1016172630) ознак академічного плагіату не виявлено.

Загальний висновок:

Вважати, що дисертаційна робота Шкриля В'ячеслава Михайловича на тему «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах», яка подана на здобуття ступеня доктора наук, за актуальністю, ступенем новизни, науковим рівнем та практичною цінністю, змістом відповідає вимогам, передбаченим пунктами 7 та 9 Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук (Постанова Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 р. № 1197 із змінами, внесеними згідно з Постановою КМ № 502 від 19.05.2023).

Рекомендувати дисертаційну роботу Шкриля В'ячеслава Михайловича на тему «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах» подану на здобуття ступеня доктора наук до захисту у спеціалізованій вченій раді Д 26.198.01 за спеціальністю Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України 03.00.02 – Біофізика.

Рецензент



Шуба Ярослав Михайлович
д.б.н., проф., акад. НАН України,
завідувач відділу нервово-м'язової фізіології
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Рецензент



Сторожук Максим Вікторович
д.б.н., ст.н.с., провідний науковий співробітник відділу
фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту
фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Рецензент



Струтинський Руслан Борисович
д.б.н., ст.н.с., провідний науковий співробітник відділу
загальної та молекулярної патофізіології Інституту
фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України