

ВІДЗИВ

завідувача кафедри патофізіології
Національного медичного університету імені О.О. Богомольця,
доктора медичних наук, професора
Панової Тетяни Іванівни

на дисертаційну роботу

Грищенко Олексія Вадимовича

ВПЛИВИ МУТАЦІЙ КАЛЬЦІЙЗВ'ЯЗУЮЧИХ БІЛКІВ ТА ЗМІН ДЕПОЗАЛЕЖНОГО ВХОДУ ІОНІВ КАЛЬЦІЮ НА ФУНКЦІОНУВАННЯ ЗБУДЛИВИХ ТА НЕЗБУДЛИВИХ КЛІТИН,

представленої на здобуття вченого ступеня доктора біологічних наук
03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Актуальність роботи зумовлена тією важною роллю, яку виконує кальцій у клітині. Зокрема іони кальцію – це універсальний вторинний посередник між зовнішніми чинниками і внутрішніми процесами в клітині. Підтримання кальцієвого гомеостазу досягається за рахунок узгодженого функціонування Са-транспортних систем плазматичної мембрани та внутрішньоклітинних органел та їх взаємної регуляції. Тому досконале знання механізмів регуляції кальцієвого гомеостазу відкриває можливості лікарської корекції внутрішнього життя клітини, за умови його ушкодження. Треба признати, що незважаючи на великі відкриття у цій царині, існує ще багато нез'ясованого. Наприклад, ряд захворювань (таких як раптова смерть від зупинки серця в систолі, панкреонекроз) пов'язані з порушеннями саме кальцієвого гомеостазу, але у якій саме ланці виникають ці порушення, і як їх можна усунути, сьогодні ще невідомо. Тому дана робота, що присвячена вивченню клітинних та молекулярних механізмів, залучених до кальцієвої регуляції в клітинах різних типів в нормі і патології, є своєчасною і актуальною.

Теоретичне значення роботи полягає у тому, що вона містить ряд відкриттів, які розширюють сучасні фундаментальні уявлення про кальцієвий гомеостаз у збудливих і незбудливих клітинах. Ці нові знання необхідно використовувати і у курсах викладання фізіології у вузах медичного і біологічного профілю, і у дослідницькій роботі науковців, і при розробках нових лікарських препаратів. Ось ці відкриття:

1. доведено, що скорочення кадіоміоциту можуть ініціюватися і виникати не тільки завдяки іонним струмам через плазматичну мембрану, але й завдяки спонтанному коливанню концентрації кальцію в клітині (принаймні на етапі ембріогенезу),
2. в основі синдрому раптової смерті (коли серце скорочується з надмірною силою і зупиняється в систолу, не в змозі розслабитися), лежать такі порушення кальцієвого гомеостазу:

- надмірне зростання кальцію у цитозолі, коли кальцій не повертається до ретикулуму (таке буває при нокауті кальційзв'язуючого білку кальсеквестрину), при цьому прискорюється вихід з інактивації депокерованих кальцієвих каналів (Ca_v1.2) плазматичної мембрани;
 - надмірне зростання афінності скоротливих білків до кальцію (таке буває при мутаціях тропоніну Т);
3. доведено, що в незбудливих клітинах (на прикладі ацинарних панкреатичних клітин) кальцієвий струм через плазматичну мембрану є наслідком спустошення внутрішньоклітинних кальцієвих депо, і відбувається через депокеровані кальцієві канали CRAC,
 4. показано, що причиною панкреонекротичної дії аспарагінази (за дією – це аналог жирної їжі, алкоголю) є активація кальцієвих каналів CRAC плазматичної мембрани, і як результат – надмірне підвищення кальцію в клітині, що в кінцевому рахунку і призводить до загибелі клітини;
 5. припускається роль зірчастих клітин у складі панкреатичних лобул: найвірогідніше саме їх активність відповідає за виникнення почуття болю при панкреатиті;
 6. показано, що через мембрани зірчастих клітин, що входять до складу панкреатичних лобул, також проходять кальцієві струми, і це відбувається саме у відповідь на дію брадикініну, відомого медіатора болю, а блокада цих струмів блокаторами брадикінінових рецепторів B2 запобігає розвитку некрозу ацинарних клітин;
 7. показано, що в панкреатичних лобулах є нервові і імунні клітини, і контактують вони не з ацинарними клітинами, а саме із зірчастими і імунними. Це дуже цікавий факт з точки зору розуміння взаємодії клітин в організмі. І цей факт ще очікує свого вивчення і пояснення.

Практичне значення роботи полягає у тому, що автор фактично створив фундамент для нової концепції молекулярно-таргетної (або молекулярно-прицільної) терапії тих патологічних станів людини, що пов'язані з порушенням кальцієвого гомеостазу і надмірним накопиченням кальцію в клітинах. Автор зробив це на прикладі таких станів:

1. запобігання синдрому раптової смерті у людей з мутаціями тропоніну Т. У цьому випадку конкретними мішенями для таргетної терапії може бути:
 - інактивація вхідного струму натрій-кальцієвого обмінника у плазматичних мембранах кардіоміоцитів,
 - кальцієва десенсибілізація міофіламентів;
2. лікування панкреатиту гострого і хронічного. У цьому випадку конкретних мішеней для впливу запропоновано більше:
 - активація АТФ-ази мембран саркоплазматичного ретикулуму, яка забезпечить наповнення ретикулуму кальцієм, а це, у свою чергу, зменшить надмірне надходження кальцію до ацинусів через депокеровані канали CRAC;
 - блокування депокерованих Ca каналів плазматичної мембрани ацинусів, яке може запобігти накопиченню кальцію в ацинусах і

запобігти розвиненню некрозу ацинарної клітини, що викликаний жирними кислотами, алкоголем;

- блокада брадикінінових рецепторів B2, з метою запобігти болю і некрозу ацинарних клітин;
- використання галактози, яка зменшує концентрації внутрішньоклітинного кальцію, з метою зменшення ступеню некрозу при гострому панкреатиті

Переваги молекулярно-таргетної терапії – у її надзвичайно локальній дії, коли можливо використовувати фармакологічну субстанцію, націлену на певний конкретний білок, який несе мутацію або інші генетичні зміни. Така таргетна терапія – це прогресивний і багатообіцяючий напрямок у медицині сьогодення.

Ступінь надійності одержаного фактичного матеріалу, обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у роботі, є дуже високим. Ось складові, що гарантують цей високий ступінь:

1. *Коректне використання сучасних експериментальних методів, які відповідають меті та задачам дослідження.* При виконанні роботи були задіяні:

- електрофізіологічні методи дослідження;
- флуоресцентні методи (реєстрація змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію);
- культивування та диференціювання кардіоміоцитів з плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин;
- імуноцитохімічні методи (морфологію зірчастих клітин і макрофагів вивчали за допомогою лазерного конфокального скануючого мікроскопа);
- моделювання виникнення некрозу ацинарних клітин та розвитку гострого панкреатиту;
- статистичні методи обробки отриманих результатів.

У методичному розділі також ретельно описані процедура ізоляції клітин, підходи щодо приготування панкреатичних лобул, охарактеризовані розчини, що були використані в експериментах, а також описано технологію навантаження клітин антитілами та флуоресцентними індикаторами.

2. *Сукупність змістовного фактичного матеріалу, який подано у експериментальній частині роботи,* органічно пов'язана з метою та завданнями дисертації, а також із ґрунтовним аналізом літературних даних. Роботі властивий високий наочний рівень подання фактичних даних: дисертація проілюстрована 11 рисунками. Висновки, що були зроблені у роботі, цілком віддзеркалюють фактичні результати, які одержав дисертант.

3. *Надійна попередня апробація накопиченого фактичного матеріалу.* Основні положення дисертації доповідалися на 14 наукових форумах в Україні та світі, опубліковані на сторінках 16 авторитетних фахових журналів, у тому числі з кватилей Q₁ та Q₂, що цитуються у Scopus / Web of Science.

4. *Високий науковий потенціал, притаманний дисертантові.*

По-перше, аналітичний рівень висвітлення питання щодо сучасного стану досліджень у галузі механізмів кальцієвої регуляції клітин відповідає рівню найновіших світових уявлень із цієї проблеми.

По-друге, виконання фундаментальної роботи вимагало від автора ґрунтовної теоретичної та методичної підготовки не тільки у галузі фізіології, але й знань із мембранології, біофізики, біохімії, фармакології, токсикології.

По-третє, дисертант володіє навичками активного застосування математичного апарату для кількісного аналізу власних експериментальних даних та їхньої інтерпретації.

По-четверте, у роботі наявне змістовне та критичне обговорення власних експериментальних результатів. Зокрема, автор створив інтегральну картину участі депозалежних каналів у виникненні некрозу ацинарних клітин підшлункової залози.

Достовірність і новизна наукових положень, висновків та рекомендацій, сформульованих у дисертації. Завдяки використанню сучасних методичних підходів, вперше у кардіоміоцитах, як типових електрозбудливих клітинах, що здатні до скорочення, показана важлива роль кальційзв'язуючих білків у формуванні та регуляції змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. В роботі вперше зареєстровано кальцієвий струм через плазматичну мембрану ацинарних клітин підшлункової залози, що активується вивільненням Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму. Доведено, що саме вхід іонів кальцію через депозалежні канали являє собою основний фактор, що призводить до некрозу клітин при більшості патологій, котрі призводять до виникнення гострого панкреатиту. Вперше в клітинах у структурі панкреатичних лобул були встановлені зміни кальцієвої сигналізації, що спричиняються брадикініном в концентраціях, які є типовими для панкреатиту. Отримані дані вказують на можливість панкреопротективної дії блокаторів брадикінінового рецептору другого типу (B2), та продемонстровано, що їх використання запобігає некрозу ацинарних клітин.

У процесі ознайомлення із дисертаційною роботою виникли запитання:

1. Ви з'ясували, що на ранніх стадіях ембріогенезу скорочення кардіоміоцитів відбувається не завдяки ПД, а за рахунок спонтанних коливань концентрації внутрішньоклітинного кальцію – а який механізм цих внутрішньоклітинних спонтанних коливань, за рахунок чого?

2. А чи є CRAC канали в кардіоміоцитах? Чи є можливий внесок CRAC каналів в розвиток аритмії серцевих скорочень при мутаціях тропоніну чи нокауті кальсеквестрину-2?

3. В роботі зазначено, що вивільнення іонів кальцію із ретикулуму відбувається через IP-3 та ріанодинові рецептори. Яка роль цих рецепторів в розвитку патологій, які Ви вивчали? Можливо, порушення саме цих рецепторів відіграє важливу роль при виникненні гострого панкреатиту?

4. У чому полягає загальнобіологічний сенс різної спрямованості причинно-наслідкових подій потрапляння кальцію у цитозоль у збудливих і незбудливих клітинах:

- в кардіоміоцитах в цитозоль спочатку потрапляє кальцій ззовні, через потенціалкеровані L-канали, а потім у цитозоль вивільняється кальцій з саркоплазматичного ретикулуму;
- а в незбудливих панкреотичних клітинах, навпаки, у цитозоль спочатку вивільняється кальцій з депо, а потім вже у цитозоль заходить кальцій ззовні через депо керовані канали.

5. І в збудливих, і в незбудливих клітинах Ви спостерігали позитивний зворотний зв'язок, коли потрапляння кальцію в цитозоль з одного місця спричиняє потік кальцію в цитозоль з другого місця. Але ж некерований позитивний зв'язок – завжди є причиною ушкоджень. Який в нормі існує механізм припинення/обмеження накопичення кальцію в цитозолі – в кардіоміоцитах і в панкреоацинусах?

6. В ацинарних клітинах Ви спостерігали позитивний зворотний зв'язок: чим більше була концентрація внутрішньоклітинного кальцію через спустошення депо – тим більше зростає вхід кальцію ззовні через плазматичну мембрану. Як Ви можете пояснити збільшення входу кальцію в клітину при збільшенні його концентрації в клітині? Адже в такому випадку і зменшений трансмембранний градієнт концентрації, і зменшений електрохімічний градієнт мали б заважати входу кальцію ззовні.

Побажання, зауваження:

1. Незважаючи на обмеження об'єму формату автореферату, все ж таки необхідно деякі речі описувати більш детально. Хоча б з огляду на те, що робота фундаментальна, і її можуть читати і студенти, і викладачі вишів. Наприклад, в тексті йдеться про реєстрацію скорочення кардіоміоцитів. Але ж не описано, як саме вимірювали параметри скорочення. І тільки в одному місці, у підпису до рисунку 1, мимохідь, у декількох словах зазначено, що на самому ділі вимірювали не механічні параметри скорочення, а інтенсивність пропускового світла, яка змінювалася при скороченні. Зрозуміло, що для вузьких спеціалістів це само собою зрозумілі речі, але ж, з огляду на важливість популяризації наукових даних, бажано викладати матеріал більш детально.

2. Не зрозуміло, навіщо Ви вивчали імунні клітини? Може вони відіграють якусь важливу чи специфічну роль при розвитку панкреатиту?

3. Деякі рисунки занадто великі, краще було б їх розбити на дві чи три додаткові панелі.

4. В тексті зустрічаються описки, пунктуаційні помилки.

Проте, 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 і представляються добре обґрунтованими.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота Грищенка Олексія Вадимовича «Впливи мутацій кальційзв'язуючих білків та змін депозалежного входу іонів кальцію на

функціонування збудливих та незбудливих клітин» є завершеною науково-дослідною працею, у якій наведене теоретичне та експериментальне вирішення наукової задачі клітинної біології, що полягає у експериментальному обґрунтуванні перспективності розробки нових підходів до фармакокорекції порушень кальцієвого гомеостазу в різних типах клітин – збудливих і незбудливих. Це дозволить удосконалити фармакотерапію, наприклад, таких захворювань, як панкреатит, хвороби серця тощо, що має суттєве значення як для науки, так і для практики сучасної охорони здоров'я.

За актуальністю обраної теми, об'ємом виконаних досліджень, науковою новизною, практичним значенням дисертаційна робота Грищенко О.В. «Впливи мутацій кальційзв'язуючих білків та змін депозалежного входу іонів кальцію на функціонування збудливих та незбудливих клітин» відповідає сучасним вимогам, які пред'являються до дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора наук, а саме п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567 (зі змінами), а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора біологічних наук із спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Завідувач кафедри патофізіології
НМУ імені О.О. Богомольця,
доктор медичних наук, професор

 Т.І. Панова

Підпис д.мед.н., проф. Панової Т.І. засвідчую

Вчений секретар
НМУ імені О.О. Богомольця,
к.мед.н.



В.С. Паливода