Рецензія

провідного наукового співробітника відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, доктора біологічних наук Струтинського Руслана Борисовича

на дисертаційну роботу

Єльяшова Семена Ігоровича

«Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура»,

представлену на спеціалізовану вчену раду ID 6322 Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України для розгляду та проведення разового захисту дисертації на здобуття ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи.

Незважаючи на велику кількість досліджень сигнальних шляхів та регуляторних механізмів активності рецепторів, їх взаємодії в механізмах регуляції роботи сечового міхура (СМ) досі залишаються недостатньо дослідженими. Роботу сечового міхура регулюють механочутливі рефлекси з залученням ЦНС. Значна увага приділяється автономній механочутливості СМ, який має дві нервово-незалежні реакції на механічні подразнення: розслаблення та скорочення. Є декілька іонних каналів залучених до регуляції роботи СМ, основним з яких у механізмах розтягнення вважається TREK-1, яким механізм відповідає за механостимульоване скорочення детрузора за відсутності нейронного або уротеліального сигналювання залишається не зовсім вивченим. Порушення нормальної механочутливості призводить до дисфункції СМ. Вивчення механізмів автономної механочутливості СМ і участі мембранних каналів у регуляції роботи СМ дозволить розробити нові підходи до лікування дисфункції СМ.

Отже, вважаю, що дисертаційна робота Єльяшова Семена Ігоровича «Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура» безперечно є актуальною.

Наукова новизна отриманих результатів, теоретичне та практичне значення дослідження.

Дисертаційна робота Єльяшова С. І. безперечно має наукову новизну. Вперше автором було показано існування механостимульованих Ca^{2+}/Na^{+}-струмів у гладенько-м'язових клітинах (ГМК) детрузора та існування 3-х окремих популяцій ГМК детрузора за типом механочутливості. Наведено раніше відсутні докази

функціональної присутності каналу Piezo1 у ГМК детрузора, що проявлялись Yoda1-індукованими Ca^{2+} сигналами. Крім цього, відсутність Piezo1-подібних трансмембранних струмів від Yoda1 можуть бути доказом субклітинної локалізації каналу. Вперше було показано Piezo1-опосередковане інгібування калієвих струмів в ГМК, що може бути пов'язане з непрямою дією мобілізованого Ca^{2+} на АТР-чутливі калієві канали.

Практичне значення дисертаційної роботи полягає в новій корисній інформації для дослідників фармакологічного та медико-біологічного профіля, оскільки стосується регуляції роботи сечового міхура. Визначення природи деполяризуючого Ca^{2+} механочутливого каналу в ГМК детрузора є потенційною мішенню для регуляції роботи сечового міхура у механочутливих розладах. Також досліджували роль TRPV4 в роботі м'язової тканини, роль Piezo1, що інгібував АТР-чутливі калієві канали. Подібної реакції на активацію Ca^{2+}-провідного каналу не демонстрували раніше ні на ГМК детрузора, ні на інших типах клітнн, що свідчить про відкриття потенційно иового системного регулятора активності м'язових клітии через інгібування АТР-чутливих калієвих каналів. Отримані результати можуть бути корисиими при розробці нових лікарських засобів.

Теоретичне значення дослідження полягає у використанні отриманих під час виконання дисертаційної роботи результатів для подальших наукових досліджень та введення нового матеріалу у спецкурси для навчання студентів відповідного профілю.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи.

Дисертантом було опрацьовано та критично оцінено наявні в науковій літературі дані щодо тематики дослідження. Отримані результати та зроблені висновки цілком обґрунтовані, оскількн були отримані на достатній кількості експериментального матеріалу із застосуванням сучасних та адекватних методів дослідження. Зокрема, Семен Ігоровнч використовував такі сучасні методи дослідження як patch clamp в конфігурації "ціла клітина", візуалізація Ca^{2+}-сигналів кальційчутливими флуоресцентними барвниками, поліланцюгова реакція (ПЛР) зі зворотною транскрипцією, гель-електрофорез, цистометрія, тензометричні вимірювання скорочення-розслаблення мязової смужки, імуноцитохімія, ферментативне ізолювання клітин гладенького м'язу і аферентних нейронів дорзальних корінцевих гангліїв, метод гідродинамічної стимуляції, механічна активації скляним зондом та інші. Представлені результати коректио статистично оброблені та надані в дисертаційній роботі з використанням табличного та ілюстративиого матеріалу. Отримані автором результати піддані

сучасному статистичному аналізу, зокрема, для статистичного аналізу отриманих даних використовувалося наступне програмне забезпечення Аналіз та графічне представлення результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Clampex 9.0, Origin 8.5. Електрофізіологічні графіки наводили як середнє значення за 5 секунд. Величини зазначали як середнє ± стандартна похибка середнього (SEM). Для експериментів з визначенням кальцієвих сигналів F/Fo рахували як середнє пікове значення під час прнкладання агенту порівнювали з передуючим «нульовим» значенням для кожиої аплікації окремо. Діаграми "бокси", що відображали усереднення значень, розкид та кілька додаткових параметрів (медіану, віддалені дані – «аутлаери») виводили за допомогою усереднення необроблених оригінальних даних за певного відрізку часу (25 мс) після чого виводили середнє арифметичне по групі та рахували стандартну похибку середнього. Порівняння груп проводили за допомогою Т-тесту Вельша у випадку неоднакової кількості даних у вибірці. Нормальність в цьому випадку розподілу не визначали, оскільки було показано, що цей тест може використовуватись без втрати ефектнвності для ненормальних вибірок, так само, як і для нормальннх за кількістю значень. Для вибірок, в яких Т-тест Вельша не давав очікуваних результатів застосовували парний Т-тест Вілксона, що підходить для роботи з вибірками, що мають аутлаери. Для обрахунків використовували мову програмування R (версії 2023.03).

В ході роботи дисертантом було проаналізовано 199 літературних джерел, поставлені задачі та відповідна мета робота. Автор внсвітлює свої результати в доступній формі, послідовно викладаючи отримані результати, починаючи з демонстрації механочутливості сечового міхура, далі – дослідженням експресії найбільш ймовірних механорецепторів, що мають бути присутніми в цьому оргаиі та послідовним і повним функціональним дослідженням цих каналів у гладеньком'язовій клітині. Відкрита автором неоднорідність чутливості ізольованих гладеньких міоцитів до механічної стнмуляції та специфічна активація Piezo1 доведена статистично методом Т-тесту Вельша та Т-тесту Вілксона за домогою мови програмування R.

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

Дисертаційна робота проводилась на базі відділу Нервово-м'язової фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Автор роботи проводив дослідження у рамках відомчих тем НДР відділу Нервово-м'язової фізіології за наступними темами: "Іонні канали – рецептори фізико-хімічних впливів у регуляції збуджеиня-скорочення вісцеральних м'язів у нормі та патології" (номер реєстрації: ДР № 0118U007351), "Іонні канали як мішені фармакологічного впливу" (номер

реєстрації: ДР № 0124U001683), "Роль TRPM8- і TRPV1- каналів у функціонуванні гладких м'язів урогенітального тракту самців щурів" (номер реєстрації: ДР № 0116U004470), а також був частиною гранту "Міогенні механізми механочутливості сечового міхура в нормі і при діабеті 2-го типу" (номер реєстрації: ДР № 0120U104960) 2020.02/0189 від Національного Фонду Досліджень України.

Структура, обсяг і повнота викладення матеріалів дисертації.

Дисертаційна робота написана українською мовою в академічному стнлі, структура та зміст якої відповідають вимогам, затвердженнм наказом МОН України від 12 січня 2017 року №40 «Про затвердження вимог до оформлення дисертації». Анотація написана українською та англійською мовами з повноціннм описом суті дисертаційної роботи. Робота викладена на 140 сторінках, із иих основного тексту – 106, та містить посилання на 199 джерел актуальної фахової літератури.

Дисертаційна робота складається із анотації, вступу (що включає в себе глибокий аналіз сучасного стану проблеми на 18 сторінок), огляду літератури, матеріалів і методів дослідження (які містять детальне викладення методології роботи, та матеріалів використаних в ході роботи викладені на 21 сторінці), розділу результатів та їх обговорення, що містить 6 підрозділів (які включають в себе докладне викладення усіх отриманих в ході роботи результатів, викладеннх на 47 сторінках), висновків та списку використаної літературп (використано 199 літературнних джерела). Використана в дисертацій література є сучасною та логічно пов'язаних з темою роботи. Дисертаційиа робота добре ілюстрована і документована, 39 оригінальних ілюстрацій та схем. Матеріали дисертації викладені на 140 сторінках, із них основного тексту – 106.

Опрацьованість літературних джерел.

Єльяшов С. І. ґрунтовно ознайомився з достатньою кількістю сучасних літературнних джерел, які переважно належать до останніх років досліджень, про що свідчить огляд літератури. Більш ранні роботи належать лише до осиовиих фундаментальних досліджень. Під час підготовки та иаписання дисертаційної роботи опрацьовано 199 наукових публікацій.

Відповідність встановленим вимогам щодо оформлення

Представлена дисертаційна робота є завершеною науковою працею, написана за традиційною схемою. Дисертація написана українською мовою на 140 сторінках, складається з анотації, змісту, списку умовнних скорочень, вступу,

огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, розділу результатів та їх обговорення, що містить 6 підрозділів, висновків, списку використаної літератури.

Викладення матеріалу дисертації в наукових публікаціях.

Результати дисертаційного дослідження опубліковані у чотирьох статтях в фахових журналах (дві статті у Фізіологічному журналі (Київ, україна), що індексується у наукометричній базі Scopus, одна – у фаховому журналі України, та четверта – у іноземному фаховому журналі Neurourology and urodynamics). Також результати роботи були представлені на 6-ти фаховнх конференціях з публікацією тез, доповідями та постерними сесіями. Загальна кількість публікацій згідно з правил є достатньою для захисту дисертаційної роботи на здобуття ступеия доктора філософії з біології.

Академічна доброчесність

Робота Єльяшова Семена Ігоровича пройшла перевірку на плагіат, що підтверджує дотримання автором принципів академічної доброчесності.

Запитання до дисертанта.

1. Чому в тензометричних експериментах на м'язових смужках для задання базального робочого напруження смужкн використовували навантаження 3 мН?
2. Чому за результати ПЛР та імуноцнтохімії вказують на присутність TRPV4 у детрузорі, тоді як використання селектнвного активатора TRPV4 - GSK1016790a в експериментах з вимірюванням трансмембранних струмів не дало жодних сигналів?
3. Чому для визначення достовірності змін щільності контрольного та індукованого струму використовували різні статистичні методи, в одному випадку Т-тест Вельша (зокрема, рис. 3.5), в іншому випадку тест Вілксона (рис. 3.8).
4. На вашу думку, яким сигнальним шляхом активація Piezo1 може призводити до інгібування АТФ-чутлнвих калієвих каналів, і яку роль в цьому механізмі може відігравати Piezo1-іидуковане підвищення цитоплазматичної концентрації Ca^{2+}?

Зауваження до дисертації.

1. В методах не потрібно вказувати, що тваринам проводили декапітацію, чи яким чином їх умертвляли. Потрібно просто вказати, що тварину вивели з експерименту на такому-то етапі.

Проте висловлені зауваження не знижують якість роботи, не мають принципового характеру, не стосуються концепції та висновків дисертаційного дослідження і не впливають на загальну позитивну оцінку роботи.

Загальний висновок.

Дисертаційна робота Єльяшова Семена Ігоровича «Характеристика механочутливих іонних каналів в гладеньком'язових клітинах детрузора сечового міхура щура», яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за актуальністю, науковою новизною отриманих результатів, науковим та методичним рівнем, теоретичним та практичним значенням, обсягом виконаних досліджень, змістом та оформленням повністю відповідає вимогам «Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44, вимогам до опублікування результатів дисертацій на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук, затверджених наказом Міністерства освіти і науки України № 1220 від 23 вересня 2019 року, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 р. та відповідає напряму наукових досліджень за спеціальністю 091 «Біологія» третього освітньо-наукового рівня вищої освіти Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, а її автор, Єльяшов Семен Ігорович, заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Рецензент

Провідний науковий співробітник відділу
загальної та молекулярної патофізіології
Інституту фізіології імені О.О. Богомольця
НАН України,

Доктор біологічних наук Руслан СТРУТИНСЬКИЙ