

ВИСНОВОК

про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації
**«Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній
довготривалій синаптичній депресії»,**
здобувача наукового ступеня доктора філософії **Оліфірова Бориса Олексійовича**
з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Затверджено на засіданні фахового семінару відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, протокол від 4 липня 2025 р. № 04.

1. Актуальність теми дослідження.

Одним із ключових вторинних посередників в нейронах виступають Ca^{2+} , і відповідними подальшими ланками сигналізації виступають численні білки, що здатні зв'язувати ці йони. Серед них варто виокремити сімейство нейронних кальцієвих сенсорів, представником яких є гіпокальцин (hippocalcin/HPCA). До особливостей будови та функціонування HPCA належить наявність активного міристильного перемикача. Цей механізм дозволяє білку Ca^{2+} -залежним чином вбудовуватись до ліпідних мембран, оскільки залишок міристинової кислоти на N-кінці вивільняється з гідрофобної кишеньки лише у Ca^{2+} -зв'язаному стані. Попри те, що HPCA є одним з найбільш високо експресованих буферів Ca^{2+} в нейронах і у гіпокампі поступається концентрацією лише кальмодуліну, він лишається надзвичайно мало вивченим. Наявні дослідження розглядають HPCA як важливу ланку сигналізації в численних формах нейронної пластичності. Відомо, що HPCA безпосередньо залучений до регуляції повільної постгіперполяризації (slow afterhyperpolarisation/sAHP), різновиду короткотривалої нейронної пластичності що регулює максимальну можливу частоту активності нейронів. Також відома потенційна роль HPCA в регуляції NMDA-рецептор залежної довготривалої синаптичної депресії (long-term depression/LTD). Цей механізм полягає у можливій взаємодії із β -субодиницею комплексу адаптерних білків 2 (AP2B1). Стабілізація AP2 на мембрані через взаємодію із HPCA може сприяти ініціації клатрин-опосередкованого ендцитозу (clathrin-mediated endocytosis/CME) AMPA-рецепторів впродовж індукції LTD. Додатковим свідченням, що дозволяє припустити участь HPCA у регуляції CME, є підтверджена висока спорідненість до мінорного фосфоліпіда плазматичної мембрани – фосфатидилінозитол-4,5-біфосфата (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate/ PIP2), що також є критичним у регуляції CME. Також відомо, що точкові мутації в гені Hрса асоційовані із розвитком важкого неврологічного розладу, первинної ізольованої дистонії 2 типу (DYT2). Актуальні дослідження впливу DYT2-асоційованих мутацій на біофізичні властивості HPCA показали, що мутантні форми білка мають погіршену здатність до олігомеризації та суттєво меншу афінності до Ca^{2+} . Зважаючи на дуже високі рівні експресії HPCA в структурах гіпокампа розглядається, що можливою ланкою молекулярного патогенезу DYT2 може виступати не тільки порушення в конкретних сигнальних каскадах, але й загальна пертурбація буферної системи Ca^{2+} в нейронах. Не зважаючи на беззаперечну роль Ca^{2+} як вторинного посередника в нейронах, HPCA лишається мало вивченими й переважна частка висновків щодо сигналізації HPCA спирається на непрямі фізіологічні та біохімічні дослідження. Актуальність дисертаційного дослідження полягає в глибших дослідженнях HPCA як вторинного посередника в кальцієвій сигналізації однієї з основних форм довготривалої синаптичної пластичності, NMDA-рецептор залежній

довготривалій синаптичній депресії. А використання сучасних підходів візуалізації живих клітин дозволила дослідити процеси локальної просторово-часової сигналізації НРСА у відповідь на активацію синаптичних рецепторів на рівні, що до цього не зустрічався в відомих дослідженнях.

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

Робота виконана в рамках наукової тематики відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (0124U001556). Дисертант входить до колективів виконавців двох грантів тематики яких безпосередньо дотичні до теми дисертаційного дослідження: «Гіпокальцин-залежна регуляція довготривалої депресії в нормі та при первинній дистонії» (Конкурс наукових, науково-технічних робіт та проєктів, які фінансуються за рахунок зовнішнього інструменту допомоги Європейського Союзу для виконання зобов'язань України у Рамковій програмі Європейського Союзу з наукових досліджень та інновацій «Горизонт 2020», проєкт 0123U102767) та «*Nanoscale Hippocalcin Signaling in Long-Term Depression in Norm and Primary Dystonia*» (Long-Term Funding by the Polish Academy of Sciences and U.S. National Academy of Sciences, проєкт PAN.BFB.S.BWZ.405.022.2023).

3. Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше проведено порівняння між характеристиками Ca^{2+} -залежного перерозподілу гіпокальцина між різними типами клітинних мембран та вмістом у мембранах мінорного фосфоліпіда PIP_2 в живих клітинах із простою морфологією.

В межах розробки експериментальної моделі фармакологічно індукованої довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії вперше використано метод іонофорезу для тривалих локальних прикладань фармакологічних агентів до окремих нейронів в культурі. Проведено валідацію застосованості цього експериментального підходу як ефективної альтернативи прикладанням розчинів фармакологічних агентів шляхом заміни всього об'єму розчину в експериментальній камері.

Вперше проведено спостереження за поведінкою нейронного кальцієвого сенсора в живих нейронах гіпокампа на рівні окремих структур дендритного дерева у відповідь на різні патерни активації NMDA-рецепторів та впродовж індукції довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії; досліджено потенційну білок-білкову взаємодію із компонентом комплексу адаптерних білків 2 з використанням Фьорстеровського резонансного перенесення енергії.

4. Особистий внесок здобувача в одержанні наукових та практичних результатів, що викладені в дисертаційній роботі.

Дисертантом самостійно проведено аналіз наукової літератури за тематикою дослідження, виконано основний об'єм експериментальних досліджень, розроблено програмні рішення для аналізу експериментальних даних та проведено статистичну обробку результатів. Дисертант спільно з науковим керівником розробив дизайн експериментальних досліджень, сформулював мету та завдання дисертаційного дослідження.

5. Обґрунтованість наукових положень та висновків.

Отримані результати відповідають сучасним науковим уявленням в галузі досліджень синаптичної передачі та біофізики кальцій-зв'язуючих білків, використано актуальні підходи для математичного і статистичного аналізу результатів. Положення та висновки, отримані автором у процесі дослідження, належним чином аргументовані та науково обґрунтовані. Правдивість сформульованих у дисертації наукові концепції та висновки ґрунтуються на результатах оригінальних експериментальних досліджень, аналіз і обговорення отриманих результатів викладені логічно і послідовно.

6. Теоретичне та практичне значення результатів дисертації.

Зважаючи на вже відомий прямий вплив точкових мутацій в гені *Hrca* на розвиток орфанного неврологічного захворювання первинної ізольованої дистонії типу DYT2, отримані результати щодо залученості кальцієвого сенсора в розвитку довготривалої синаптичної пластичності можуть лягти в основу кращого розуміння механізмів молекулярного патогенезу означеного неврологічного захворювання. Розуміння ролі гіпокальцина як мішені для генної терапії із застосуванням новітніх генно-інженерних підходів на основі векторів вірусної та іншої природи із подальшим провадженням доклінічних досліджень є прямим шляхом практичного застосування результатів дисертаційного дослідження.

7. Перелік публікацій за темою дисертації.

7.1. Опубліковані основні результати роботи із зазначенням особистого внеску здобувача:

- Ye. Sheremet, **B. Olifirov**, A. Okhrimenko, V. Cherkas, O. Bagatskaya, P. Belan (2020) *Hippocalcin Distribution Between the Cytosol and Plasma Membrane of Living Cells*. *Neurophysiology* 52(1). **Q4**. DOI 10.1007/s11062-020-09845-6.
(Особистий внесок здобувача - розробка підходів до аналізу даних конфокальної мікроскопії, розробка програмних рішень для напівавтоматичного аналізу зображень, аналіз зображень та статистична обробка результатів).
- **B. Olifirov**, O. Fedchenko, A. Dovgan, D. Babets, V. Krotov, V. Cherkas, P. Belan (2025). *Local Iontophoretic Application for Pharmacological Induction of Long-Term Synaptic Depression*. *Bio-protocol* 15(11): e5338. **Q2**. DOI: 10.21769/BioProtoc.5338.
(Особистий внесок здобувача - дизайн дослідів, розробка програмного забезпечення для аналізу мікроскопічних зображень, проведення серій дослідів із валідації техніки іонофорезу та детекції FRET, статистична обробка результатів, написання тексту публікації та оформлення ілюстративного матеріалу).

7.2. Засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

- **Б. Оліфіров**, Є. Шеремет, П. Білан. *Просторова локалізація білку гіпокальцину в живих клітинах за низької внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+}* . XVIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики». 12-13 травня 2020 року, Київ, Україна.
- O. Fedchenko, S. Nevelchuk, **B. Olifirov**, P. Belan. *Biophysical properties of Ca^{2+} -dependent hippocalcin translocation in HEK 293 cells*. Virtual FENS Regional Meeting 2021, 25-27 серпня 2021 року, Краків, Польща.

- S. Nevelchuk, **B. Olifirov**, O. Fedchenko, P. Koval, V. Zhytniuk, P. Belan. *Interplay between local cell morphology and kinetics of hippocalcin calcium-dependent insertion*. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation. 15-17 червня 2022 року, Київ, Україна.
- O. Fedchenko, **B. Olifirov**, S. Nevelchuk, P. Koval, V. Zhytniuk, P. Belan. *Calcium-dependent hippocalcin distribution between different subcellular compartments*. All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation. 15-17 червня 2022 року, Київ, Україна.
- **B. Olifirov**, S. Nevelchuk, P. Koval, P. Belan. *Biophysical properties of hippocalcin signaling in different sub-cellular compartments*. FENS Forum 2022, 9-13 липня 2022 року, Париж, Франція.
- **Б. Оліфіров**, П. Білан. *Спостереження за розподілом Ca^{2+} -залежного вбудовування гіпокальцина в плазматичну мембрану та впливом на цей процес морфології клітин*. XX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики». 15 червня 2022 року, Київ, Україна.
- О. Федченко, **Б. Оліфіров**, П. Білан. *Дослідження розподілу Ca^{2+} -залежного вбудовування гіпокальцина в нейронах гіпокампу*. Сьома міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології». 3-4 жовтня 2024 року, Дніпро, Україна.
- **Б. Оліфіров**. *Гіпокальцин як потенційна сигнальна ланка в регуляції ендоцитозу синаптичних AMPAR та індукції довготривалої синаптичної депресії*. Сьома міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології». 3-4 жовтня 2024 року, Дніпро, Україна.
- **B. Olifirov**, O. Fedchenko, N. Voitenko, V. Cherkas, P. Belan. *Hippocalcin interaction with adaptor protein complex 2 underlies localization and duration of hippocampal LTD induction*. Society for Neuroscience Annual Meeting 2024, 5-9 жовтня 2024 року, Чикаго, США.
- D. Biruk, O. Fedchenko, Ye. Sheremet, **B. Olifirov**. *Comparison of hippocalcin translocation and minor phospholipid distribution*. Наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «KyivAcademUs 2025», 7-9 травня 2025 року, Київ, Україна.

Дисертаційна робота виконана у відділі **біофізики сенсорної сигналізації** Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, науковий керівник **д.б.н., проф. Білан Павло Володимирович**.

Дисертаційна робота **Оліфірова Бориса Олексійовича**, яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своєю актуальністю, ступенем наукової новизни, обґрунтованістю, науковою та практичною цінністю результатів 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 МОН України від 23 вересня 2019 р. № 1220, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами, внесеними наказом МОН України від 31

травня 2019 р. №759) та відповідає напрямку наукових досліджень освітньо-наукової програми Біологія (Біофізика; Фізіологія людини і тварин; Патологічна фізіологія) третього освітньо-наукового рівня вищої освіти Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України зі спеціальності 091 Біологія.

Перевірка дисертаційної роботи **Оліфірова Бориса Олексійовича** на плагіат показала, що дисертація є результатом самостійних досліджень здобувача і не містить елементів плагіату та запозичень. Використані ідеї, результати і тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

8. Рекомендація дисертації до захисту

Дисертаційну роботу **Оліфірова Бориса Олексійовича** «Участь гіпокальцину в **NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії**», подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 Біологія, може бути рекомендовано до офіційного захисту з врахуванням висловлених зауважень.

Пропонується такий склад разової спеціалізованої вченої ради:

голова ради:

д.мед.н., проф., чл.-кор. НАН України **Скибо Галина Григоріївна**, завідувачка відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

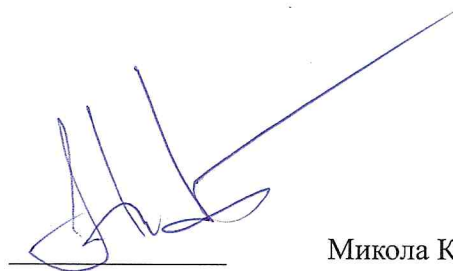
рецензенти:

- к.б.н. **Романенко Сергій Вячеславович**, старший науковий співробітник відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;
- д.мед.н. **Цупіков Олег Михайлович**, провідний науковий співробітник відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

опоненти:

- д.б.н., проф. **Жолос Олександр Вікторович**, завідувач кафедри біофізики та нейробиології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;
- к.б.н. **Крисанова Наталія Валеріївна**, старший науковий співробітник відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Головуючий на засіданні
фахового семінару відділу біофізики
сенсорної сигналізації



Микола КОНОНЕНКО



Витяг № 1
з протоколу від «4» липня 2025 р. № 04
засідання фахового семінару відділу біофізики сенсорної сигналізації
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Голова засідання: д.б.н., ст.н.с. Кононенко М.І.

Секретар: к.б.н., Шеремет Є.Ю.

Присутні:

з відділу біофізики сенсорної сигналізації: т.в.о. зав. відділу, д.б.н., проф. Білан П.В.; ст.н.с., д.б.н. Кононенко М.І.; пров.н.с., д.б.н. Півнева Т.А.; ст.н.с., к.б.н. Романенко С.В.; н.с., к.б.н. Черкас В.П.; м.н.с., к.б.н., Шеремет Є.Ю.; інж. Оліфіров Б.О; інж. Блащак І.О; інж. Устименко В.О.

з відділу цитології: завідувач відділу, чл.-кор. НАН України, д.мед.н., проф. Скибо Г.Г.; пров.н.с., д.мед.н. Цупіков О.М.

запрошені науковці й студенти ЗВО та наукових установ.

Слухали:

Доповідь **Оліфірова Бориса Олексійовича** за матеріалами дисертації «**Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії**» на здобуття наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія.

Запитання до здобувача ставили:

д.б.н. Білан П.В. — стосовно порівняння просторових розподілів флуоресцентно міченого фосфоліпіду PIP2 та неспецифічної флуоресцентної мембранної мітки;

д.б.н. Жолос О.В. — стосовно методів статистичного аналізу; алгоритму вирівнювання в часі мініатюрних збуджувальних постсинаптичних струмів; про валідацію методики тривалої іонофоретичної аплікації NMDA та можливу оцінку концентрації діючої речовини;

д.мед.н. Скибо Г.Г. — стосовно кореляції між розміром постсинаптичної щільності та розвитком довготривалої синаптичної депресії в первинній культурі нейронів гіпокампа.

Виступили:

Ст.н.с., к.б.н. Романенко С.В., пров.н.с., д.мед.н. Цупіков О.М. відзначили актуальність теми дисертаційного дослідження Оліфірова Бориса Олексійовича, сучасність методологічної бази, відповідність мети та завдань дослідження, достатність обсягу й значимості отриманих результатів, ступені обґрунтованості висновків, а також відповідність змісту і оформлення дисертації до вимог, які висуваються до дисертаційних робіт на здобуття наукового ступеня доктора філософії. Запропонували текст Висновку про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації.

В обговоренні взяли участь фахівці: д.б.н. Білан П.В., д.б.н. Кононенко М.І., к.б.н. Романенко С.В., к.б.н., Шеремет Є.Ю., д.мед.н. Скибо Г.Г., д.мед.н. Цупіков О.М.

Ухвалили:

Затвердити Висновок про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації Оліфірова Бориса Олексійовича «Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії». Висновок про наукову новизну, теоретичне та практичне значення результатів дисертації додається.

Вважати, що Дисертаційна робота Оліфірова Бориса Олексійовича, яка подана на здобуття ступеня доктора філософії, за своєю актуальністю, ступенем наукової новизни,

обґрунтованістю, науковою та практичною цінністю результатів 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 МОН України від 23 вересня 2019 р. № 1220, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України від 12 січня 2017 р. № 40 (зі змінами, внесеними наказом МОН України від 31 травня 2019 р. № 759) та відповідає напряму наукових досліджень освітньо-наукової програми Біологія (Біофізика; Фізіологія людини і тварин; Патологічна фізіологія) третього освітньо-наукового рівня вищої освіти Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України зі спеціальності 091 Біологія.

Рекомендувати роботу Оліфірова Бориса Олексійовича «Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії» на здобуття наукового ступеня доктора філософії галузі знань 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія до захисту.

Подати на розгляд вченої ради Інституту наступний склад разової спеціалізованої вченої ради:

голова спеціалізованої вченої ради:

д.мед.н., проф., чл.-кор. НАН України **Скибо Галина Григоріївна**, завідувач відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

рецензенти:

к.б.н. **Романенко Сергій Вячеславович**, старший науковий співробітник відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;

д.мед.н. **Цупіков Олег Михайлович**, провідний науковий співробітник відділу цитології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

опоненти:

д.б.н., проф. **Жолос Олександр Вікторович**, завідувач кафедри біофізики та нейробіології, Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

к.б.н. **Крисанова Наталія Валеріївна**, старший науковий співробітник відділу нейрохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Голосування: «за» — 10, «проти» — немає, «утримались» — немає.

Головуючий на засіданні
фахового семінару відділу біофізики
сенсорної сигналізації

Секретар засідання



Микола КОНОНЕНКО

Євгеній ШЕРЕМЕТ

