

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу

Шеремета Євгенія Юрійовича

«Експресія та просторовий розподіл нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину в субклітинних компартментах», представлена на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Актуальність проблеми

Нейронні кальцієві сенсорні (NCS) білки разом з кальційзв'язувальними білками суперсімейства EF-hand-вмісних білків є унікальними сигнальними білковими структурами, які в нервовій системі не лише формують буферну ємність для Ca^{2+} , а і виконують функцію посередника між змінами $[Ca^{2+}]_i$ та клітинною відповіддю. NCS білок гіпокальцин сигналізує в дендритах гіпокампальних нейронів шляхом кальційзалежної транслокації з цитозолу на плазматичну мембрану. Показано, що гіпокальцин є важливим елементом механізмів NMDAR-залежної довготривалої депресії синаптичної передачі (LTD) та струму повільної постгіперполяризації – клітинних корелятив пам'яті. Аномалії в рівні експресії та роботі гіпокальцину пов'язані з розвитком нейродегенеративних захворювань, епілепсії та розладів розвитку мозку. Розуміння того, як гіпокальцин сигналізує в гіпокампальних нейронах, та які параметри його роботи змінюються при тому чи іншому розладі, може стати ключем до якісної профілактики та терапії.

Останні дослідження демонструють, що точкові мутації в гені гіпокальцину зустрічаються в пацієнтів, хворих на аутосомно-рецесивну первинну ізольовану дистонію (DYT2), головним проявом якої на рівні

нервової системи є підвищена неконтрольована мережева активність. Це наводить на думку, що гіпокальцин підтримує LTD та sAMP постійно, навіть при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$, постійно знижуючи активність усіх клітин в мережі. Точкові мутації, що перешкоджають нормальній роботі гіпокальцину, ймовірно, призводять до тотального підвищення збудливості клітин, і, як наслідок, до клінічних проявів DYT2 дистонії. З огляду на те, що білки-мішені гіпокальцину перебувають на плазматичній мембрані дендритів та дендритних шипиків, цікавим стає питання концентрації гіпокальцину на мембрані даних субклітинних компартментів за умов спокою, при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$.

Розгляд описаних у дисертаційній роботі результатів, їхня наукова новизна та обґрунтованість

Дисертація присвячена визначенню концентрації NCS білка гіпокальцину, а також його розподілу між цитозолем та плазматичною мембраною при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$, тобто у стані спокою клітин. Зважаючи на описаний вище зв'язок гіпокальцину з різноманітними розладами нервової системи, тематика дисертаційної роботи безперечно є актуальною у фундаментальному і прикладному аспектах.

Особливо хочу відзначити зразково високий методичний рівень роботи. Для виконання мети дослідження дисертант зі своїми співавторами спершу розробили універсальний підхід до оцінки концентрації флуоресцентно мічених білків. Запропонований підхід має великий потенціал для практичного застосування, адже з його допомогою можна проводити вимірювання практично будь-яких флуоресцентних та флуоресцентно мічених білків в клітинах різних типів, а також визначати рухому та нерухому (імобілізовану у внутрішньоклітинних

компартментах) фракції флуоресцентних білків. Автор наголошує, що багато математичних маніпуляцій зі спектрами оптичних компонентів можна провести один раз та використовувати дані напрацювання протягом усього періоду експлуатації флуоресцентної установки.

Використовуючи конфокальну мікроскопію та метод відновлення флуоресценції після фотознебарвлення, дисертантом вперше було проведено оцінку одновимірного коефіцієнта дифузії гіпокальцину. Аналіз параметрів дифузії гіпокальцину та суто мембранного білка вказує на те, що гіпокальцин при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ переважно є цитозольним білком, хоча невелика частина молекул може бути вбудована в плазматичну мембрану. Подальші експерименти в роботі Шеремета Є. Ю. тільки підтвердили цю гіпотезу: оцінка мембранної частки гіпокальцину в клітинах НЕК 293 становить 8%, в той час як останні літературні дані оцінюють кількість гіпокальцину на мембрані на піку кальцієвого транзйєнта як 40–60%. Автор справедливо зазначає, що така порівняно невисока кількість гіпокальцину на мембрані може викликати лише помірну активацію мембранних білків-мішеней гіпокальцину у стані спокою.

Дисертація має чітку структуру, в якій є вступ, 4 розділи, висновки, список літератури і один додаток. Робота гарно ілюстрована рисунками і таблицями. Дисертація написана гарною мовою, хоча подекуди зустрічаються орфографічні, граматичні та пунктуаційні помилки. В усіх серіях описаних дослідів докладно подається експериментальний дизайн та всі проведені маніпуляції, а результати подаються й обговорюються, спираючись на достатню кількість літературних даних.

Проте існує кілька **зауважень та питань**, які лише свідчать про значний інтерес до піднятої в дисертації проблематики:

1. Відомо, що олігомери гіпокальцину здатні зв'язуватися з потенціал-залежними кальцієвими каналами. Чи справді є переконливі

експериментальні докази, що НРСА здатний активувати також калієві канали або це притаманне тільки іншим членам родини нейронних кальцієвих сенсорів – білкам, що активують калієві канали, KChIPs? Якщо так, то які механізми цього впливу?

2. Чи може змінюватися функціональна активність НРСА у відповідності до числа окупованих сайтів зв'язування кальцію, або ж завжди повинні бути зайняті 3 з 4 EF-hand доменів? Якщо відповідь так, то які, на Ваш погляд, можуть бути функціональні наслідки?
3. Ефективність трансфекції на рівні 1-5% для нейронів гіпокампа все ж видається замалою. Причина в культурі клітин гіпокампа? Або замість плазміди потрібно було взяти лінійну ДНК? Можливо для збільшення ефективності трансфекції варто було б використовувати ультразвук?
4. На перший погляд Ваша робота може здатися надмірно сфокусованою на методичних питаннях. І зроблено це, безумовно, блискуче. Вирішенню якої саме фундаментальної проблеми сприяли Ваші дослідження? Яким чином ваші дані можуть бути використані для подальшого вивчення ролі гіпокальцину в регуляції нейронних функцій?
5. Міристинування є невід'ємною частиною апоптозу або запрограмованої загибелі клітин. Апоптоз необхідний для підтримки гомеостазу клітин і виникає, коли клітини знаходяться в стані стресу, такого як, наприклад, гіпоксія або пошкодження ДНК, викликане впливом радіації. У зв'язку з цим виникає питання, чи є гіпокальцин сенсором стресових станів або він бере участь в регуляції клітинних функцій в стані фізіологічного спокою?

Відповідність вимогам, які висуваються до дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Висловлені зауваження та питання не применшують високого наукового рівня роботи. Кількість і якість отриманих експериментальних даних свідчать про адекватність і ефективність використаних автором методів. Усі дослідження виконані на високому методичному рівні, а розроблені підходи перевірені на точність у контрольних експериментах, що не залишає сумніву у високій **достовірності отриманих результатів**. Висновки роботи відповідають меті та завданням дослідження, є гарно формалізованими та добре обґрунтованими.

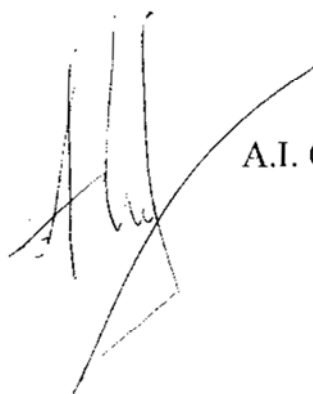
Результати дисертаційної роботи Шеремета Є. Ю. опубліковано в 6 працях, при **цьому** одна з них відноситься до першого квартилю (Q1). Публікації цілком відповідають змісту дисертації. Матеріали роботи також було представлено автором на всеукраїнських міжнародних наукових конгресах і конференціях. Отже, матеріали дисертації достатньо апробовані, а ступінь їх подання відповідає вимогам. Зміст автореферату повністю відповідає основним положенням дисертації.

Висновок. Дисертаційна робота Шеремета Є. Ю. є завершеним науковим дослідженням, що вносить істотний вклад у розуміння клітинної сигналізації білка гіпокальцину в дендритах гіпокампальних нейронів в умовах спокою.

Вважаю, що робота за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною і практичною цінністю отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам п.11 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. №567 (зі змінами), які висуваються

кандидатських дисертацій, а її автор – Шеремет Євгеній Юрійович – заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент,
доктор медичних наук, професор,
Завідувач відділу фармакології
клітинних сигнальних систем
та експериментальної терапії
Державної установи «Інститут фармакології
та токсикології НАМН України»



А.І. Соловійов

*Згідно з д.лев.н. професора
Ф.І. Соловйова засвідчує*

Заступник директора з наукової роботи

07.09.2019



Тригор'єва Т.С.