

РЕЦЕНЗІЯ

доктора медичних наук, провідного наукового співробітника
відділу цитології

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

Цупикова Олега Михайловича

на дисертаційну роботу

Оліфірова Бориса Олексійовича

«Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній

довготривалій синаптичній депресії»

виконану на здобуття ступеня доктора філософії

з галузі знань 09 Біологія

за спеціальністю 091 Біологія

Актуальність теми дисертаційної роботи

Дисертаційне дослідження присвячене вивченню ролі гіпокальцину (НРСА) – одного з найменш досліджених нейрональних кальцієвих сенсорів – у механізмах довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії (LTD). Тема роботи є вкрай актуальною, оскільки механізми LTD є базовими для формування пам'яті, навчання та адаптаційної перебудови нейронних мереж.

Ca²⁺-залежна здатність гіпокальцину транслокуватись до мембран і взаємодіяти з β -субодиницею комплексу AP2 вказує на потенційну роль у запуску ендоцитозу AMPA-рецепторів. З огляду на те, що LTD є не лише фізіологічним процесом, але й залучена до розвитку нейродегенеративних змін і когнітивних порушень, глибше розуміння її молекулярних механізмів є критично важливим. Мутації гена *Hrsa* безпосередньо асоційовані з рідкісною формою дистонії (DYT2), що відкриває шлях до застосування фундаментальних знань про НРСА у медицині.

Незважаючи на це, молекулярні механізми дії НРСА досі залишаються нез'ясованими, що обґрунтовує потребу в подальших дослідженнях із використанням сучасної біофізичної візуалізації.

Отже, дослідження Бориса Оліфірова заповнює важливу прогалину в сучасній нейробіології, з'єднуючи між собою фізіологію, біофізику та молекулярну біологію.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значущість

У дисертаційній роботі вперше здійснено детальний аналіз поведінки кальцієвого сенсора HRCa в живих клітинах у відповідь на протоколи активації NMDA-рецепторів. Автором розроблено нову методику тривалих локальних іонофоретичних прикладань NMDA, яка дозволила моделювати LTD на рівні окремих нейронів. Це має методичну цінність і може бути використане в інших лабораторіях.

Також уперше продемонстровано, що гіпокальцин динамічно переміщується до специфічних зон дендритного дерева у відповідь на тривалу NMDA-активацію, ймовірно виконуючи роль “човникового транспорту” для білків адаптерного комплексу AP2. Використання FRET-мікроскопії дало змогу виявити потенційну фізичну взаємодію HRCa з β -субодиницею AP2B1 саме під час розвитку LTD. Це суттєво зміцнює гіпотезу про роль HRCa у запуску клатрин-опосередкованого ендоцитозу AMPA-рецепторів.

Практична значущість роботи пов'язана з перспективою таргетування HRCa у терапії неврологічних станів, зокрема спадкової дистонії. Розкриття механізмів мембранного вбудовування HRCa, його залежності від рівнів Ca^{2+} і PIP2, дозволяє розглядати цей білок як нову регуляторну ланку в складній мережі синаптичної сигналізації.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень й висновків

Обґрунтованість результатів заснована на широкому наборі сучасних методик, які використовуються в роботі з високою технічною точністю. Експериментальна частина вражає своїм обсягом і якістю та широкою палітрою використаних експериментальних методів: автор використав методи молекулярної біології для культивування клітин лінії НЕК 293 і первинної культури нейронів гіпокампа щура, та для транзійентної експресії рекомбінантних флуоресцентно мічених цільових білків в живих клітинах;

автор виконав серії дослідів з іонофорезом, patch-clamp реєстрацією, фотоіндукованим вивільненням Ca^{2+} , конфокальною та епіфлуоресцентною мікроскопією, а також FRET-аналізом білок-білкових взаємодій.

Кожне наукове положення дисертації логічно підкріплене експериментальними даними. Методика обробки результатів є прозорою і науково вивіреною: використано кількісний аналіз, статистичну валідацію, контрольні умови. Окремо слід відзначити, що експерименти проведено як на нейронах, так і на клітинній лінії НЕК 293 — це дозволяє верифікувати дані в простіших моделях. Результати подано з належною інтерпретацією та в контексті сучасної літератури, що свідчить про глибоку поінформованість здобувача. Робота містить переконливу аргументацію й демонструє наукову зрілість дисертанта.

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 двох грантів дотичних до 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).

Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Обсяг дисертації 157 сторінок; робота складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень та скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, розділів результатів та узагальнення результатів і

висновків. Робота містить 31 рисунок, 5 таблиць, 2 додатки та список використаних джерел на 143 найменування.

Зауваження та запитання до дисертаційної роботи

Позитивно оцінюючи роботу Бориса Оліфірова, слід висловити деякі дискусійні зауваження:

- 1) У тексті дисертації автор вказує на потенційну клінічну значущість гіпокальцину при дистонії 2 типу. Було б корисно додати окремий підрозділ в огляді літератури з глибшим аналізом мутацій *Hrca* і механізмів їх впливу на функціональність білка.
- 2) У дисертаційній роботі було поставлено 5 завдань, а висновків сформульовано 6. Бажано було б і кількість висновків зменшити до 5.

Запитання:

1. Як Ви можете пояснити специфічність участі гіпокальцину саме у механізмах LTD, а не LTP, враховуючи, що обидва процеси є Ca^{2+} -залежними і активуються через NMDA-рецептори?
2. Наскільки результати, отримані з використанням флуоресцентно мічених конструкцій гіпокальцину, можуть відображати поведінку ендогенного білка за фізіологічних умов?

Висловлені зауваження і запитання не впливають на загальну позитивну оцінку дисертаційної роботи, вони мають лише дискусійний або уточнювальний характер.

Загальний висновок офіційного опонента

Дисертаційна робота 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 відповідними наказами МОН

України) 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.

Рецензент

доктор медичних наук,
провідний науковий співробітник
відділу цитології
Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України

 Олег ЦУПІКОВ

