ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА
кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника відділу фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії
ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»
Сидоренка Вадима Геннадійовича

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи
Лунько Олесі Володимирівни
«Модуляція катіонних каналів великої провідності внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркіньє мозочка щурів»

представленої на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність проведених досліджень

Ядро еукаріотів є однією з головних органел клітини. Його функції полягають в зберіганні та дублювання генетичної інформації, а також у забезпеченні життєдіяльності клітини шляхом регуляції синтезу різних білків. Ядерна мембрана, як один з компонентів ядра, бере участь у механізмі передачі сигналів з ядра в цитоплазму, опосередковуючи таким чином безліч фізіологічних процесів - транскрипцію генетичної інформації, транспорт РНК, макромолекул та іонів. Ці процеси забезпечуються досконалими транспортними системами, що включають в себе велику кількість іонних каналів різних типів. За останні десятиріччя в ядерній мембрані різних клітин - ооцитів, клітин підшлункової залози, кардіоміоцитів, клітин гладких і поперечно-смугастих м'язів, а також нейронів ЦНС, були виявлені й описані катіонні й аніонні канали, канали чутливі до АТФ і кальцій-залежні іонні канали, а також ріанодін- та інозитол-3-фосфат-чутливі канали.

В ядерній оболонці клітин ЦНС, наприклад гранулярних нейронів і пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампу, а також раніше на внутрішній мембрані ядра нейронів Пуркіньє мозочка, були описані катіонні канали великої провідності (Large conductance cationic channels, LCC) (Marchenko et al., 2005. Fedorenko et al., 2010). Ці канали формують селективну до моновалентних катіонів пору з провідністю близько 200 пСм. Однак структура і функції цих каналів до теперішнього часу не досліджені, а так само відсутня інформація про блокатори, що ускладнює з'ясування фізіологічної ролі цих каналів. Представлена до захисту дисертаційна робота ставить за мету вирішення однієї з ключових фундаментальних проблем – всебічно охарактеризувати особливості кінетики та встановити фармакологічний профіль

катіонних каналів великої провідності (LCC канали), локалізованих у внутрішній мембрані ядра нейронів Пуркіньє.

Таким чином, дисертація Лунько О.В. відповідає вимогам актуальності для наукового дослідження і має значну теоретичну й практичну цінність.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

Відповідно до поставлених цілей автором дисертації було отримано ряд нових даних про характеристики струмів LCC каналів внутрішньої мембрани ядра нейронів Пуркіньє щурів під впливом модулюючих факторів різної природи. Серед них на особливу увагу заслуговують такі:

- Виявлено перший блокатор LCC каналів d-тубокурарин (dTC), який відомий як конкурентний антагоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів, і є також блокатором інших типів каналів, таких як кальцій-залежні калієві канали великої (ВК канали) та малої провідності (SK канали). Автором проведено скринінг природних отрут змій та скорпіона і встановлено, що блокатори LCC каналів містяться в компонентах отрут скорпіона лісового (H. laoticus), кобри моноклевої (N. kaouthia) і крайта стрічкового (B. Fasciatus).

- Також виявлено, що LCC канали ефективно інгібуються галламіном, який є так званим недеполяризуючим блокатором, та іонами гадолінію.

- Вперше побудована кінетична модель взаємодії каналу з швидким блокатором галламіном із використанням інноваційного підходу на основі аналізу β-розподілу амплітудних гістограм.

- На основі флуктуаційного аналізу струмів через канал в широкому діапазоні мембранного потенціалу побудована топологічна модель Маркова, яка передбачає існування п'яти станів каналу: одного відкритого, одного підрівня і трьох закритих станів.

Теоретична цінність отриманих результатів полягає у з'ясуванні біофізичних характеристик і фармакологічного профілю LCC каналів в ядерній мембрані нейронів Пуркіньє. Це розширює наші знання про транспортні механізми ядерної мембрани, як одного з головних компонентів в процесах внутрішньоклітинної сигналізації.

Практична цінність роботи полягає в можливості фармакологічного впливу через LCC канали на потенціал ядерної мембрани, який, в свою чергу, може впливати на тривалість кальцієвих сигналів між нуклеоплазмою і цитоплазмою клітини або змінювати фактори транскрипції РНК.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Достовірність наукових положень, які виносяться на захист, базується в першу чергу на великому масиві одержаних експериментальних даних, які отримані з використанням методу реєстрації струмів поодиноких іонних каналів – «петч-кламп» в конфігурації «inside-out», оцінки впливу фармакологічних речовин і статистичної обробки результатів, що цілком відповідає поставленій меті і завданням роботи.

Застосування моделювання трансмембранних струмів дозволило авторові отримати точну оцінку впливу швидкого блокатора - галламіна, та, що важливо, встановити механізм його дії. Використана модель базується на аналізі флуктуацій струму через канал і симуляції амплітудних гістограм, дозволяючи таким чином підібрати оптимальні значення параметрів, що забезпечують формування найбільш підходящої до експериментальних даних теоретичної моделі. Цей вагомий результат є безумовно важливим для подальшого дослідження цих каналів, в тому числі для дослідження модуляції їх активності в процесі взаємодії з будь-якими хімічними сполуками.

Загалом Лунько О.В. показала себе компетентним науковцем, якії володіє сучасними методами досліджень і здатний до критичного аналізу отриманих результатів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного мозку в нормі та патології».

Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам

Дисертаційна робота Лунько О.В. оформлена відповідно до «Вимог до оформлення дисертації», затверджених наказом МОН Україні № 40 від 12.01.2017 р. Роботу викладено на 155 сторінках, що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів досліджень, опис та ілюстрації результатів досліджень, обговорення результатів, висновки та список цитованої літератури (305 джерел). Методи досліджень та отримані результати проілюстровані 46 рисунками і 4 таблицями, які дають повне уявлення як про методику проведених експериментів, так і про якість отриманих даних.

У вступі автор описує проблематику, пов'язану з дослідженнями іонних каналів на мембрані ядер різних типів клітин, зокрема з відсутністю інформації про структуру та функції каналів великої провідності. Автором передбачається гіпотеза, що ці канали можуть бути залучені до формування балансу іонів калію по обидві боки від зовнішньої і внутрішньої мембран оболонки ядра і таким чином впливати на заряд ядерної оболонки. Далі автор формує загальну мету дослідження і ставить ряд конкретних завдань на шляху до її досягнення. Перераховуються використані методи дослідження, визначається наукова новизна, теоретична і практична цінність отриманих результатів. Визначається зв'язок роботи з науковими програмами Інституту фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України, де вона виконувалася, особистий внесок здобувача, апробацію матеріалів дисертаційного дослідження, публікація матеріалів дисертації в наукових виданнях і структура роботи.

Розділі 1 (Огляд літератури) висвітлює основні відомості про об’єкт та предмет дослідження. В перших підрозділах подано загальні відомості про ядерну оболонку, її структуру та про транспортні систем, які входять до її складу, що надає уявлення про нативні мембрани – середовище, в якому проводяться дослідження в даній дисертаційні роботі. В загальних рисах окреслюється сучасний стан проблематики з акцентом на те, що на теперішній час досить мало відомостей про іонні канали ядерної оболонки, особливо про їх кінетику та значення у функціонуванні ядра. Також автор розглядає різні типи модуляції іонних каналів, що ілюструє важливість їх ролі у багатьох внутрішньоклітинних процесах. Детально описані різноманітні механізми блокування іонних каналів іонами металів та різними токсинами, що вказує проведену на колосальну роботу з літературними даними. Виділено 4 основні механізми блокування та подано приклади особливості взаємодії блокуючого агента з білковою структурою іонного каналу. Всі розглянуті питання повністю узгоджуються з основними напрямками досліджень, які проведені в даній роботі.

Варто відмітити, що особливу увагу автор приділяє якості цитованих літературних джерел. Цитується багато наукових публікацій провідних спеціалістів по дослідженню поодиноких іонних каналів. Серед них можна знайти як роботи останніх років, так і ті, що на теперішній час вже стали класичними.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) детально описано методику отримання об’єктів експериментальних досліджень, а саме процедура виділення ядер нейронів Пуркіньє та відділення внутрішньої мембрани від зовнішньої для петч-клемп реєстрацій трансмембранних струмів поодиноких іонних каналів. Особлива увага приділена опису аналізу даних. Аргументовано переваги використання аналізу β-розподілу та приведено покрокову інструкцією аналізу з відповідними ілюстраціями. Важливою особливістю цієї роботи є те, що для аналізу даних було спеціально розроблено алгоритм для визначення

тривалості швидких переходів між окремими конформаціями іонного каналу. Це дозволило проаналізувати події, тривалість яких вимірюється в мікросекундах, що недоступно для аналізу іншими алгоритмами.

Розділ 3 (Результати досліджень) включає в себе три основних підрозділи, в яких представлено результати досліджень, що стосуються пошуку блокатора для LCC каналів та опису його впливу. Одним із найбільш вагомих результатів є те, що серед великої кількості протестованих сполук було виявлено перший блокатор для LCC каналів. Інше вагоме досягнення – це вибір кінетичної схеми, яка описує основні конформаційні стани LCC каналів. Ці два відкриття є значними кроками для розвитку досліджень LCC каналів.

В першому підрозділі представлені результати пошуку блокатора для LCC каналів. Перевірено велику кількість блокаторів різних типів каналів, які виявилися неефективними. Результату впливу природних отрут добре проілюстровані репрезентативними прикладами трансмембранних струмів. Хоча отрути неочищені цілісні сполуки, проте їх дія на LCC канали надає попереднє уявлення про наявність блокатора в складі тієї чи іншої отрути. Цікаво, що найбільш ефективними видався вплив саме отрут змій сімейства аспідових, які містять нейротоксини. Виявлявся вплив на активність каналів у випадку використання всіх задіяних в експериментальній роботі природних отрут, проте результати впливу на амплітуду струму значно варіюються. Результат впливу природних отрут може представляти комплексну дію різних поліпептидів, які входять до їх складу. В такому випадку отримані результати представляють лише попередню оцінку впливу.

В одному з підрозділів описуються результати впливу лужноземельних іонів металів, а саме кальцію та магнію. Ці іони металів виявилися малоефективними в якості блокаторів, що може свідчити про відсутність сайту зв’язування на іонному каналі. Проте іони лантаноїду гадолінію викликали блокування, внаслідок чого значно зменшувалася активність досліджуваних каналів.

В результаті пошуку блокатора молекулярної природи автору вдалося знайти перший блокатор для LCC каналів, яким виявився тубокурарин. Інший виявлений блокатор, галламін, діяв в меншій концентрації, ніж тубокурарин. Обидві сполуки викали швидке блокування каналів, що також було потенціал-залежним. Вплив швидких блокаторів на поодинокі іонні канали досить складно аналізувати, оскільки аналіз амплітуди струму призводить до значних труднощів для адекватної оцінки фармакодинамічних параметрів блокування. Цікаво, що обидва знайдені блокатори для LCC каналів є також блокаторами ацетил-холінових рецепторів.

Автором була здійснена спроба проаналізувати кінетику блокування галламіна з використанням спрощеної моделі, яка складається з одного відкритого та одного блокованого

стану. Було продемонстровано переваги використання спрощеної кінетичної моделі блокування, а також обговорено недоліки такого підходу. У зв'язку з цим виникла нагальна необхідність в наявності адекватної кінетичної моделі для LCC каналів.

За допомогою аналізу β-розподілу було визначено тривалість конформаційних станів LCC каналів за контрольних умов. В результаті автором було вперше запропоновано кінетичну схему, яка описує найбільш типові події в реєстраціях поодиноких каналів за умови як негативних, так і позитивних потенціалів на ядерній мембрані. На основі проаналізованих експериментальних даних дисертанткою було встановлено, що канал перебуває в одному відкритому стані, який зв'язаний з трьома закритими станами, які мають різні константи часу перебування, та одним підрівнем. Використовуючи цю модель було визначено рівноважну константу дисоціації для галламіна та показано механізм дії цієї сполуки.

Розділі 4 (Обговорення результатів) ґрунтовно проаналізовано та узагальнено отримані результати досліджень. Автор представляє свою інтерпретацію результатів та порівнює їх із прикладами, раніше описаними в літературних джерелах.

Висновки дисертаційної роботи Лунько О. В. цілком відповідають меті та поставленим завданням, добре обґрунтовані та повністю узгоджуються з отриманими результатами.

В авторефераті дисертаційної роботи стисло викладені та проілюстровані основні результати досліджень, зроблені висновки, та коротко викладена суть робити в анотації. Автореферат повністю відображає основний зміст дисертації.

Результати, представлені в дисертаційній роботі, опубліковані у фахових виданнях та пройшли апробацію на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. По темі дисертації опубліковано 6 статей та 10 тез доповідей на конференціях.

Під час рецензування дисертаційної роботи Лунько О.В. *«Модуляція катіонних каналів великої провідності внутрішньої мембрани ядер нейронів Пуркіньє мозочка щурів»* виникли наступні **запитання та зауваження**:

1) Автор використовує для блокади каналів природні отрути різних видів змій і скорпіона. Відомо, що вони є багатокомпонентними. Чи проводився більш детальний поділ фракцій отрут, наприклад, за допомогою хромотографії, щоб виділити окремі компоненти цих отрут?

2) Відомо, що отрута крайтів (зокрема отрута крайта стрічкового) містить бета-бунгаротоксин, який є блокатором нікотинових ацетилхолінових рецепторів (н-холінорецепторів). В роботі використовувалися d-тубокурарин та галламін, також відомі як

блокатори н-холінорецепторів. Чи може автор, виходячи з отриманих даних по блокаді LCC каналів, припустити, що канал має структурні одиниці, подібні н-холінорецепторам, або взаємодія блокаторів відбувається виключно з іонною порою?

3) Зазвичай для аналізу кінетики поодиноких каналів використовується так званий "dwell-time analysis" або аналіз часу перебування каналу у відкритому і закритому станах, що дозволяє будувати гістограми розподілу. До якої міри ви збільшуєте роздільну здатність, використовуючи "β-розподіл" і чи можна було би для цієї мети використовувати інший підхід?

4) На рисунках і в тексті присутні незначні помилки: наприклад, на діаграмах амплітуд струмів на рисунках 3.1-3.4 варто було б вказати абсолютні значення струму. Оригінальні записи струмів на рисунках 3.11, 3.14 і 3.15 краще було б представити в більшому часовому масштабі, оскільки на цих рисунках неможливо відокремити поодинокі події. Рисунки 3.21 та 3.22 в тексті дисертації ідентичні, але підписи різні. Очевидно, що в рисунок 3.22 були помилково вставлені графіки для рисунку 3.21. Замість англіцизма "в печті", слід було б використовувати, наприклад, більш зрозумілий термін - "на фрагменті мембрани".

Висловлені зауваження суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Лунько Олесі Володимирівни «Модуляція катіонних каналів великої провідності внутрішньої мембрани нейронів Пуркіньє мозочка щурів» відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент

старший науковий співробітник

відділу фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії

ДУ “Інститут фармакології та токсикології НАМН України”

кандидат біологічних наук, Сидоренко В.Г.