

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу

Оліфірова Бориса Олексійовича

«Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій
синаптичній депресії»,

подану на здобуття наукового ступеня доктора філософії
у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія»

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

Дослідження довготривалої синаптичної пластичності було і залишається одним з найбільш пріоритетних напрямків нейробіологічних дисциплін протягом останніх десятиліть, адже ці процеси лежать в основі формування пам'яті, здатності до навчання, формування досвіду і навичок. У даній дисертаційній роботі були досліджені механізми індукції однієї з важливих форм довготривалої синаптичної пластичності, а саме депресії (LTD), що залежить від активності NMDA рецепторів – це форма синаптичної пластичності, при якій послаблюється сила синаптичної передачі як наслідок тривалої, але малоінтенсивної активації глутаматергічних синапсів. Це вважається вирішальним процесом у навчанні та пам'яті, який запускається певними патернами нейрональної активності.

Низькочастотна стимуляція нейронів може викликати LTD шляхом зменшення кількості AMPA-рецепторів - іншого типу глутаматних рецепторів на постсинаптичній мембрані. Відомо, що LTD зазвичай пов'язана зі тривалим входом іонів кальцію через NMDA рецептори. Крім того, різні підтипи NMDA рецепторів, що містять субодиниці NR2A або NR2B, можуть ініціювати різні форми LTD, тоді як протеїнфосфатази 1 та 2B також беруть участь у формуванні LTD шляхом дефосфорилювання білків.

Сучасне розуміння молекулярних процесів, що відбуваються при LTD все ще залишається досить обмеженим, зокрема стосовно білок-білкових взаємодій, трафіку білків та характерних патернів кальцієвої сигналізації, що визначають специфіку LTD на відміну від протилежних процесів, які натомість індукують довготривалу синаптичну потенціацію (LTP). У цьому контексті дослідження Оліфірова Б.О., основною метою якого було визначенні ролі гіпокальцина в процесі розвитку довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії в нейронах гіпокампа щурів, є безумовно актуальним.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість

Роль нейронального кальцієвого сенсора гіпокальцину у NMDA-залежній LTD була постульована ще у 2005 році у роботі Palmer et al. "Hippocalcin Functions as a Calcium Sensor in Hippocampal LTD" (Neuron, doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.014). Автори передбачали, що гіпокальцин безпосередньо зв'язується з $\beta 2$ -субодиницею адапторного комплексу AP2, який зв'язує клатрин з цитозольними доменами інтегральних мембранних білків, призначених для інтерналізації через клатриновий комплекс, і таким чином відбувається ендоцитоз AMPA-рецепторів, наслідком чого є LTD. Однак автори дослідження використали переважно молекулярно-біологічні та біохімічні методи *in vitro*, такі як ко-імунопреципітація, що залишило багато важливих питань відкритими.

Наукова новизна і цінність дисертаційного дослідження Оліфірова Б.О. полягає в отриманні не тільки *прямих доказів* важливої ролі гіпокальцину у розвитку LTD, але і у визначенні основних біофізичних і кінетичних параметрів цих процесів, у тому числі і у залежності від динаміки змін внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію як ключового вторинного

посередника, що індукує LTD. Серед найбільш вагомих результатів, які мають наукову новизну, варто відмітити наступні:

- визначені потенційні сайти гіпокальцин-індукованого ендоцитозу, що індукується довготривалою активацією NMDA рецепторів в дендритному дереві та шипиках нейронів гіпокампу;
- прямими методами, такими як FRET, доведена колокалізація та показані функціональні молекулярні взаємодії між гіпокальцином та β -субодиницею адаптерного комплексу білків 2 (AP2B1) в процесі розвитку довготривалої NMDA рецептор-залежної синаптичної депресії;
- визначено роль мінорного фосфоліпіду PIP_2 у складі мембран у процесі Ca^{2+} залежного вбудовування гіпокальцина у мембрани клітин HEK 293.

Крім того, у роботі були розвинені і використані новітні методичні підходи до дослідження даної проблематики, які теж становлять значний науковий інтерес і будуть корисними широкій науковій спільноті у галузі нейробиології та суміжних наукових дисциплін. Це, зокрема, іонофорез як метод тривалих локальних прикладань агоністів рецепторів за умови, що ці молекули мають електричний заряд, а також розробка новітніх алгоритмів та програм для аналізу цифрових мікроскопічних зображень та білок-білкових взаємодій.

З точки зору практичної значимості отриманих у роботі результатів слід зазначити, що патофізіологічні зміни LTP та LTD вважаються механізмом, який може сприяти розвитку таких різноманітних захворювань мозку, як деменція, рухові розлади, депресія, залежність, посттравматичний стресовий синдром, нейропатичний біль та тривожні розлади.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Для досягнення поставленої мети дисертаційного дослідження його автор використав комплекс комплементарних сучасних біофізичних,

електрофізіологічних, біохімічних і молекулярно-біологічних методів. Варто підкреслити, що всі ці методи і протоколи дослідження автором детально описані і проілюстровані у Розділі 2 «Матеріали та методи», розглянуті як переваги, так і технічні обмеження тих чи інших методів, а в експериментальній частині значна увага була приділена контрольним експериментам та питанням оптимізації експериментальних протоколів. Це свідчить про об'єктивність та критичність підходів авторів до досліджуваної ним проблематики, ретельно продуманий дизайн експериментів, їх планування і виконання у логічній послідовності досліджуваних аспектів проблеми індукції LTD. Отримані результати були всебічно проаналізовані з використанням адекватних статистичних тестів. По кожній серії експериментів проілюстровані репрезентативні дані, що потім підкріплюються результатами статистичного аналізу. Все це не залишає жодних сумнівів щодо високої ступені обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи.

Результати дослідження пройшли належну апробацію шляхом їх представлення на 8 наукових конференціях, серед яких привертають увагу форуми FENS та Society for Neuroscience Annual Meeting.

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). Борис Оліфіров також входить до команди виконавців двох грантів: «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, проект PAN.BFB.S.BWZ.405.022.2023).

Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Обсяг дисертації становить 157 сторінок з урахуванням Анотації та Списку використаних джерел (143 найменувань). Робота представлена за класичною схемою та складається з анотації, змісту, переліку умовних позначень та скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, трьох розділів результатів, узагальнення результатів і висновків. Робота містить 31 рисунок, 5 таблиць, 2 додатки та список використаних джерел. Варто підкреслити високий фаховий рівень автора та володіння ним фаховою термінологією, широку обізнаність з науковою літературою по темі дослідження, грамотний опис та інтерпретацію отриманих результатів.

Розділ «Огляд літератури» написаний на 30 сторінках. Він містить огляд як сучасних концепцій розвитку довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії, зокрема ролі нейронних кальцієвих сенсорів і серед них гіпокальцину, так і методів дослідження, які автор засвоїв і використав у своїх дослідженнях. Загалом огляд літератури свідчить про те, що автор здатен до критичного аналізу і узагальнення наукової літератури, є добре обізнаним з проблематикою дослідження.

Результати дисертаційного дослідження опубліковані у 2 статтях у фахових журналах, що індексуються у наукометричній базі Scopus та відносяться до 2-го і 4-го квартилей Scimago Journal & Country Rank. Крім того, результати роботи були апробовані на 8 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях. Дотримання засад академічної доброчесності в виконаному дисертаційному дослідженні додатково засвідчується

результатами перевірки на академічний плагіат з використанням програми Unichек.

Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження переважно методичного та дискусійного характеру, а саме:

1. Чи могло вплинути на властивості досліджуваних білків, наприклад на швидкість їх дифузії та вбудовування у мембрани клітин, наявність приєднаної флуоресцентної мітки? Якою є молекулярна вага міток у порівнянні з розміром досліджуваних білків?
2. Методи, розділи 2.1.4 та 2.1.5: чи проводилась оцінка ефективності транз'єнтної трансфекції клітин?
3. Методи, розділ 2.2.1: виникає питання як саме працює АМ форма фотолабільного кальцієвого хелатора NP-EGTA. Якщо калієва сіль NP-EGTA може утворювати комплекс з доданим Ca^{2+} для формування «caged» Ca^{2+} у цитозолі клітини, який здатен швидко вивільнювати Ca^{2+} після флеш-фотолізу, то як відбувається вивільнення Ca^{2+} у випадку АМ форми NP-EGTA?
4. Методи, розділ 2.2.2: яким чином підбирали оптимальні умови (потужність лазера, тривалість опромінення клітини) для фотолізу NP-EGTA? Чи проводилась оцінка відсотку фотолізу речовини і контрольні експерименти щодо можливих негативних ефектів ультрафіолетового світла на клітини?
5. Іонтофорез як методичний підхід для аплікації агоністів рецепторів має багато суттєвих переваг порівняно з додаванням речовин до усього розчину в експериментальній камері, але є і певні проблеми, такі як невизначеність концентрації діючої речовини. Чи можна якимось чином оцінити концентрацію NMDA у проведених експериментах?

6. Для приготування KCl-метансульфонатного розчину для заповнення петч-піпеток його рН доводився ймовірно з використанням КОН. Це потрібно було зазначити, як і величину рН, у Табл. 2.5.
7. Величина послідовного опору (R_s) суттєво впливає на якість фіксації потенціалу. Якого порядку вона була у петч-клемп експериментах і чи робилась компенсація R_s ?
8. Як узгоджується досить швидка кінетика повернення гіпокальцину з мембрани у цитоплазму кілтини після довготривалого іонтофорезу NMDA (Рис. 3.5В.С), а також транслокація гіпокальцину у відповідь навіть на короткі іонофоретичні прикладання NMDA тривалістю лише 2,5 с (Рис. 3.6В) із можливою участю гіпокальцину в ініціації довготривалої синаптичної депресії? Чи можна на основі цих даних стверджувати, що роль гіпокальцину полягає насамперед в індукції LTD, а не у підтриманні LTD?
9. Чи спостерігаються якісь прояви порушення NMDA-рецептор залежної довготривалої синаптичної депресії при первинній ізольованій дистонії, зокрема спричиненої точковою мутацією N75K, що суттєво впливає на афінітет НРСА до Ca^{2+} ?

Висловлені зауваження і запитання носять дискусійний характер, вони не впливають на загалом позитивну оцінку роботи.

ВИСНОВОК

Дисертаційна робота Оліфірова Бориса Олексійовича «Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії» є самостійно проведеним, оригінальним і завершеним дослідженням, яке спрямовано на вирішення актуальної наукової проблеми і яке містить нові, науково обґрунтовані дані, положення і висновки, що мають наукову, теоретичну і практичну цінність, які у своїй сукупності

вирішують багато проблемних питань стосовно участі гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії у нейронах гіпокампу.

Представлена Оліфіровим Борисом Олексійовичем дисертаційна робота на тему «Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії» відповідає усім вимогам Постанови Кабінету міністрів України №44 від 12 січня 2022 року «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» 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, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора філософії у галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія».

Офіційний опонент

завідувач кафедри біофізики та нейробиології

Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, професор

Олександр ЖОЛОС

