

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА
про науково-практичну цінність дисертаційної роботи
Болдирєва Олексія Ігоровича
"Експресія та функція низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі та соматосенсорній корі головного мозку щурів в онтогенезі та в експериментальній моделі абсансної епілепсії",
представлену на здобуття наукового ступеню кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність теми дослідження. Анти-епілептичні препарати - модулятори іонних каналів включають цілу групу лікарських засобів, одними з найбільш ефективних з яких є агоністи ГАМК_A рецепторів. Іншими молекулярними "мішенями" для лікування епілепсії є потенціалзалежні натрієві і кальцієві канали, а також глутаматні рецептори. Серед них перспективними з огляду на їх універсальну роль в генерації ритмічної електричної активності в різних типах клітин, але у той же час недостатньо дослідженими фармакологічними "мішенями" для лікування епілепсії залишаються низькопорогові кальцієві канали (НПКК, або кальцієві канали Т-типу).

У ссавців визначені 3 підтипи НПКК, які відрізняються за біофізичними та фармакологічними властивостями і які розглядаються як потенційні мішені для лікування нейрологічних, серцево-судинних та онкологічних захворювань. Добре відомо, що біофізичні властивості Т-струмів у нейронах та м'язових клітинах зазнають певних змін в онтогенезі, але молекулярні механізми цих змін встановлені недостатньо повно. Саме тому дослідження молекулярно-генетичних основ зміни експресії і відповідно біофізичних властивостей Т-струмів у нейронах таламусу і соматосенсорної кори головного мозку, що представлені в цій роботі, є безперечно актуальними.

Не менш важливим є і питання щодо ролі НПКК у виникненні дитячої абсансної епілепсії. З цього приводу існують чисельні непрямі докази, проте як саме ця роль реалізується у патогенезі захворювання залишається невідомим. Частина випадків абсансної епілепсії пояснюється мутаціями в

генах НПКК, що спостерігаються і у тваринній моделі цього захворювання – лінії щурів GAERS. Проте більшість пацієнтів не мають генетичних пошкоджень у НПКК, тому, очевидно, що на функцію Т-каналів можуть впливати певні інші фактори, в тому числі і ті, що регулюють експресію їх генів. Таким умовам відповідає обрана автором цього дослідження модель – лінія щурів WAG/Rij. Ця тваринна модель епілепсії є в цілому детально дослідженою, за виключенням саме експресії та функції каналів Т-типу.

Слід також відмітити, що нестача селективних фармакологічних модуляторів кальцієвих каналів Т-типу вносить значні обмеження як у фундаментальні дослідження в цій галузі, так і у практичне застосування їх результатів. Тому з'ясування здобувачем ролі нового класу регуляторів активності НПКК – мікроРНК – є дуже актуальним і важливим як для фундаментальних досліджень нервових та інших типів клітин, так і для подальшої розробки новітніх терапевтичних підходів на основі РНК-інтерференції.

Наукова новизна отриманих результатів. У дисертаційній роботі вперше розкриті молекулярно-генетичні основи зміни низькопорогових кальцієвих струмів у таламусі та соматосенсорній корі головного мозку в ранньому постнатальному онтогенезі. Автором вперше були зареєстровані Т-струми у нейронах латеродорзального ядра таламусу щурів з абсансами та визначено склад підтипів Т-каналів та їхні відмінності від здорових щурів. Вперше показано наявність білку підтипу Ca_v3.1 в соматосенсорній корі щурів та показано його збільшення у щурів з абсансами. В роботі також отримані результати, що характеризують першу мікроРНК в якості потенційного регулятора трансляції НПКК.

Теоретичне і практичне значення результатів дослідження. Отримані результати перш за все сприяють більш глибокому розумінню ролі кальцієвих каналів Т-типу в нейронах головного мозку за фізіологічних умов та при абсансній епілепсії. Дисертаційне дослідження також створює

підґрунтя для розробки нових підходів на основі РНК-інтерференції для пригнічення активності НПКК як при абсансній епілепсії, так і при інших каналопатіях, що пов'язані з надмірною експресією НПКК.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи. Наукові положення та висновки, наведені у дисертації, базуються на використанні комплексу сучасних методів, достатній кількості експериментів, адекватному виборі позитивних і негативних контролів, статистичному аналізу результатів експериментів, їх критичному співставленні з іншими даними в цій галузі.

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота Болдирева О.І. представлена за загальноприйнятою формою та згідно вимог МОН України. Вона складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу і узагальнення отриманих результатів, висновків і списку цитованої літератури. Дисертація містить 126 сторінок тексту та ілюстрована 25 рисунками і 1 таблицею. Список літератури нараховує 123 джерела.

У вступі всебічно розглянуто та переконливо доведено актуальність обраної теми досліджень, сформульовані мета та задачі дослідження, висвітлено особистий внесок здобувача, зазначені всі методи дослідження.

Огляд літератури складається з 3 підрозділів. У першому обговорюється роль кальцієвих каналів Т-типу в організмі ссавців, їхня молекулярна будова, біофізичні властивості, регуляція експресії генів Т-каналів. У другому підрозділі зібрані відомості про специфічні функції каналів Т-типу в досліджуваних в дисертації зонах головного мозку – в таламусі та корі великих півкуль. Третій підрозділ присвячений дитячій абсансній епілепсії людини, її тваринним моделям та обґрунтуванню вибору лінії WAG/Rij як адекватної моделі для дослідження абсансів.

Розділ "Матеріали й методи" детально описує використані у роботі методи, а саме: метод ізоляції клітин, метод петч-клемп для реєстрації

трансмембранних струмів, методи виділення РНК і білків з тканини мозку щура, реакцію зворотної транскрипції, полімеразну ланцюгову реакцію, її кількісну модифікацію - ПЛР у реальному часі, полімеразну ланцюгову реакцію для кДНК отриманої з однієї клітини, електрофорез ДНК і білків, метод аналізу експресії білків "вестерн-блот", біоінформаційні та статистичні методи. Представлені методи є сучасними та адекватними цілям дослідження. Особливо варто відмітити вдале поєднання біофізичних, молекулярно-генетичних та біохімічних підходів, що дозволило автору всебічно дослідити і підтвердити незалежними методами його основну концепцію щодо ролі НПКК як в онтогенезі, так і в експериментальній моделі абсансної епілепсії.

У розділі "Результати власних досліджень" викладено експериментальні дані, які отримані за допомогою описаних у попередній частині методів дослідження. Наведено авторську модифікацію методу полімеразної ланцюгової реакції для кДНК з однієї клітини та результати аналізу за його допомогою складу підтипів Т-каналів у нейронах таламусу з попередньо зареєстрованими кальцієвими струмами. У цьому розділі також представлено дані щодо зміни рівнів мРНК кальцієвих каналів Т-типу в латеродорзальному ядрі таламусу під час раннього постнатального періоду онтогенезу. Також наведено результати дослідження Т-каналів у латеродорзальному, сітчастому ядрах таламусу та в соматосенсорній корі щурів з абсансами в порівнянні з контрольними здоровими щурами. В останньому підрозділі описано пошук мікроРНК, що потенційно може взаємодіяти з підтипом $Ca_v3.2$ НПКК та вимірювання її рівня в таламусі кори здорових щурів та щурів з абсансами.

Розділ "Аналіз та узагальнення результатів" містить кваліфіковане обговорення отриманих даних, порівняння їх з результатами інших дослідників, критичний та всебічний аналіз тих обмежень та можливих артефактів, яке має дисертаційне дослідження, та перспективи щодо подальшого вивчення НПКК та їхньої генетичної регуляції як за

фізіологічних умов, так і при патологічних станах. Автор повно та аргументовано обговорює отримані результати. Все це свідчить про високий теоретичний рівень автора роботи.

Розділ "Висновки" складається з узагальнювального висновку та чотирьох положень, які підводять підсумки отриманих наукових результатів. Висновки чіткі, вони цілком відповідають поставленим завданням та отриманим результатам.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертації опубліковані у 5 статтях у рецензованих міжнародних журналах, 2 з яких у міжнародних наукових виданнях з імпаکت-фактором, 2 – в українських виданнях, внесених до міжнародних наукометричних баз. Результати також представлено в 14 доповідях на наукових конференціях. Автореферат дисертаційної відповідає основним її положенням, добре ілюструє основні результати та розкриває суть дослідження.

Під час рецензування роботи виникли **наступні запитання:**

1. Наскільки оригінальною та суттєвою є модифікація методу ПЛР для оцінки експресії генів в поодиноких нейронах, щоб включати цей розділ у Результати власних досліджень, а не в розділ «Матеріали і методи дослідження», а також зазначати у висновках роботи?
2. За якими критеріями була проведена ізоляція Т-струмів (рис. 3.7)?
3. З якою метою проводився аналіз експресії $Ca_v2.3$, адже це не згадується ні в завданнях, ні у висновках роботи?
4. Загальною проблемою комерційних антитіл для визначення експресії білків, що формують різні типи іонних каналів, є їх низька селективність. Наскільки це стосується використаних в роботі антитіл?

В цілому високо оцінюючи дисертаційну роботу Болдирева О.І., все ж варто зробити деякі **зауваження** та висловити **побажання** щодо подальшого розвитку цих досліджень:

1. В Огляді літератури варто було б навести діаграму будови мікро-РНК, що сприяло б кращому розумінню складного матеріалу, що викладений у розділі 1.1.4.
2. На ілюстраціях оригінальних реєстрацій іонних струмів (рис. 3.6, 3.15б) слід зазначати базовий рівень струму при підтримуваному потенціалі мембрани, а також нульовий рівень струму, адже це несе важливу інформацію.
3. В розділі 3.2.1 зазначається, що *“Ферментативна обробка призводить до втрати нейронами аксону та дендритного дерева, для збирання цитоплазми доступна лише сома нейрона та окремі проксимальні частини дендритів”*. В подальших дослідженнях очевидно важливо буде визначити експресію Т-каналів у відростках нейронів, можливо із застосуванням первинної культури клітин.
4. На рис. 3.9 і 3.14 розриви у шкалі утруднюють візуалізацію змін експресії мРНК, особливо це стосується Ca_v3.1.
5. В роботі зустрічаються деякі неточності в термінології та інтерпретаціях, а також дещо невдалі вирази, наприклад: “Характер цього руху розшифровується молекулами шляхів внутрішньоклітинного сигналіngu”, “за допомогою машинерії активного відкачування”, “деінактивація Т-каналів” (очевидно це вихід з інактивованого стану).

Слід підкреслити, що висловлені зауваження і побажання до подальших досліджень суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок

Згідно з “Порядком присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника”, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р., 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 Болдирєва Олексія Ігоровича “*Експресія та функція низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі та соматосенсорній корі головного мозку щурів в онтогенезі та в експериментальній моделі абсансної епілепсії*”, 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,

професор і в.о. завідувача кафедри біофізики

ННЦ “Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук Жолос О.В.

Підпис Жолоса О.В. засвідчую

директор ННЦ “Інститут біології”

Київського національного університету імені Тараса Шевченка, доктор біологічних наук,

професор Остапченко Л.І.

ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР ННЦ
КАРАУЛЬНА Н.В.
03.08.2016р.