

## **ВІДГУК ОПОНЕНТА**

провідного наукового співробітника відділу нейрохімії  
Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,  
старшого наукового співробітника, доктора біологічних наук

**Шатурського Олега Ярославовича**

на дисертаційну роботу

**Надтоки Сергія Олександровича**

«Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів  
Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів»,

представлену на спеціалізовану вчену раду PhD13029

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

для розгляду та проведення разового захисту дисертації

на здобуття наукового ступеня доктора філософії

у галузі знань «09 Біологія» за спеціальністю «091 Біологія»

### **Актуальність проблематики дисертаційного дослідження**

Дослідження високопровідних катіонних LCC-каналів за допомогою лігандів адренергічних і холінергічних рецепторів є актуальним оскільки його результати можуть допомогти визначити роль LCC-каналів у регуляції процесу вивільнення  $Ca^{2+}$  з внутрішньоклітинних депо нейронів, необхідного для функціонування збудливої клітини, а також перевірити дію ще не досліджених на LCC-каналах модуляторів мускаринових холінорецепторів та адренорецепторів, що має поглибити розуміння функціональної активності LCC-каналів і особливостей хімічної будови лігандів та певних ділянок LCC-каналів, що приймають участь у регуляції опосередкованого цими каналами трансмембранного струму катіонів.

## **Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість**

Наукова новизна і значимість дисертаційного дослідження Надтоки Сергія Олександровича полягає в тому, що вперше було досліджено модуляцію струму катіонів LCC-каналами за допомогою фізіологічно активних сполук різних класів, доданих з перинуклеарного та/або внутрішнього боків мембрани ядра нейронів Пуркінє. У випадку залучення LCC-каналів до створення протиструму іонів, що впливає на вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із депо нейронів, більшість досліджених сполук можуть бути використані для регуляції LCC-каналів з метою опосередкованого впливу на кальцієву сигналізацію збудливих клітин. Таким чином, проблеми, які вирішуються у цій роботі, можуть бути актуальними для біофізики, біохімії та інших галузей природничих наук, таких як медицина, через спектр патологій, що пов'язані з порушеннями процесу вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  із депо нейронів та міоцитів у випадку, якщо цей процес залежить від проведення струму LCC-каналами.

## **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи**

Наукові положення та висновки дисертаційної роботи достатньо обґрунтовані та достовірні. Висновки сформульовані чітко та логічно впливають із результатів досліджень. Методологічний підхід, використаний дисертантом, базований на застосуванні інформативного та точного інструментарію, заснованого на сучасному методі дослідження шляхом фіксації потенціалу (петч-клямпу) на мембрані ядер нейронів Пуркінє. Використані у роботі методи та статистичні підходи одержання і оцінки результатів є досить

різноманітними (клітинно-біологічні, електрофізіологічні, математично-статистичні тощо) та цілком адекватними поставленій меті дослідження, а одержані результати є статистично підтвердженими з застосуванням сучасного комп'ютерного програмного забезпечення (Origin 2018, США), чим дисертант засвідчує високий рівень його професійного вишколу. Всі маніпуляції з лабораторними тваринами проведені відповідно до вимог правил біоетики прийнятних в науковій практиці міжнародної спільноти і України.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційну роботу було виконано у рамках відомчих тематик «Молекулярні механізми неврологічних розладів та можливі шляхи їх корекції» (№ державної реєстрації 0124U001713, 2024-2028 рр.), «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343, 2019-2023 рр.), «Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного та спинного мозку в нормі та патології» (№ державної реєстрації 0116U004473, 2017-2021 рр.), а також із використанням речовин, придбаних за кошти гранту НАН України «Фармакологічна чутливість та експресія катіонних каналів великої провідності у ядрах клітин різного типу» (№ державної реєстрації 0121U112012, 2021-2022 рр.).

### **Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи**

Загальний обсяг дисертаційної роботи Надтоки С.О. становить 171 сторінку, з яких 130 сторінок становлять «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали та методи досліджень», «Результати», «Обговорення» та

«Висновки». Структура роботи є типовою для дисертаційних робіт для здобуття наукового ступеня доктора філософії, та, окрім вищевказаних розділів, включає анотацію, зміст, перелік умовних позначень та список використаних джерел, містить 46 рисунків і 5 таблиць. Автор володіє професійною термінологією, а опис та інтерпретація результатів досліджень виконані коректно. Розділ «Огляд літератури» написаний на 23 сторінках та містить інформацію як про функціонування іонних каналів загалом, так і каналів внутрішньоклітинних органел зокрема, до яких належать і досліджувані автором LCC-канали. Особлива увага звертається на будову ядерної мембрани та її компонентів, що відповідає об'єкту досліджень, оскільки робота була проведена з використанням ядер нейронів Пуркінє мозочка щурів. Загальна кількість використаних джерел складає 165, а систематизоване викладення інформації свідчить про обізнаність автора із науковою літературою та здатністю до її критичного аналізу. Методологічні підходи, викладені на 12 сторінках відповідного розділу, описані точно і лаконічно, та є водночас достатньо повними і детальними для чіткого розуміння ходу роботи та відтворення експериментів. Результати досліджень, описані на 65-ти сторінках, представлені коректно, в повному обсязі та відповідно до описаної у методології схеми експерименту. У випадку проведення статистичної перевірки відмінностей між групами вказано розмір вибірок, а інтерпретація змін окремих параметрів при порівнянні ефектів різних речовин може бути легко проведена завдяки наведенню відсоткових значень таких змін. Описані у дисертаційній роботі результати є опублікованими у 5-ти статтях в українських та закордонних виданнях, що індексуються у базі даних Scopus. Так, 3 статті є опублікованими у «Фізіологічному журналі» (Q4 за SJR 2024), 1 стаття – у журналі «Neurophysiology» (Q4 за SJR 2024), і 1 стаття – у журналі «Acta Neurobiologiae Experimentalis» (Q3 за SJR 2024). Окрім цього, результати є апробованими на 10-ти наукових конференціях. Опубліковані праці

підтверджують зроблені автором висновки та узагальнення, а їх кількість та якість відповідає вимогам для здобуття наукового ступеня доктора філософії.

### **Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи**

При ознайомленні з дисертаційною роботою виникли декілька запитань, зауважень та побажань до автора а саме:

1. З огляду на нестачу, порівняно з каналами плазматичних мембран, експериментальних даних з вивчення каналів мембран ядра та інших органел клітини в розділі «Обговорення результатів» дисертанту варто було би скористатися вже існуючими моделями іонних каналів для порівняльного аналізу з результатами, отриманими ним на LCC-каналах. У такий спосіб автор міг би збагатити «Обговорення...» вірогідними доповненнями щодо структури та функцій LCC-каналів. Наприклад: Нещодавно видана робота автори якої характеризують LCC-канали як потенціалозалежні катіонні канали великої провідності (~200 пСм) з підстанами (O. Lunko, O. Lunko, J. Kevin Foskett (2025) BPS2025-Kinetic modeling of nuclear large conductance. *Biophys.J.*, 124(3), Supplement 1,130A-131A). У дисертаційній роботі автором також показана наявність щонайменше декількох піків провідностей усередині основного (найбільшого) стану провідності ~ 240-250, 215 та 190-195 пСм при потенціалі - 60 mV з перинуклеарного боку ядерної мембрани. Згідно з існуючими уявленнями про функціонування іонопровідних каналів наявність підстанів провідності може свідчити про складнішу ніж просто поодинокі наскрізна трансмембранна пора структуру іонопровідної частини LCC-каналу і/або про присутність заряджених угруповань каналу, що можуть впливати на відкривання або закривання регульованих ними підстанів провідності та основного відкритого стану, наприклад, залежно від знаку або величини мембранного потенціалу. З огляду на останнє припущення, блокувальну дію

атропін сульфату на амплітуду струму LCC-каналом з перинуклеарного боку ядерної мембрани, можна пояснити, наприклад, взаємодією позитивно зарядженого азоту молекули блокатора з негативно зарядженою карбоксильною групою вільної або водної порожнини каналу за якої відбувається перехід із більшого стану провідності  $\sim 215$  пСм в менший  $\sim 190$  пСм (стр 93). Вірогідно, що таке блокування провідності каналу може забезпечуватися не тільки механічним перешкоджанням молекули атропіну струму катіонів але також і певними перетвореннями структури самого каналу, що призводять до переходу в інший підстан провідності.

Незважаючи на те, що автор є цілком свідомий можливості такого типу обговорення результатів дослідження і для інших речовин: «Наявність позитивно зарядженого атому азоту в молекулі притаманна ...ацетилхоліну та карбохоліну у формі солей хлоридної кислоти... (стр.143). Можна припустити, що ця частина бере участь у взаємодії з LCC-каналами і модуляції їх властивостей.» (стр. 143) він залишає його для подальшої перевірки додатковими дослідженнями (стр. 141), чим дещо збіднює розділ «Обговорення» і іноді робить його схожим на повтори «Результатів» та «Висновків».

2. Зводячи «Обґрунтування теми дослідження» до перевірки дії модуляторів холінорецепторів та адренорецепторів на LCC-канали для визначення і аналізу «...особливостей хімічної будови модуляторів, які опосередковують регулювання окремих параметрів електрофізіологічної активності LCC-каналів» (стр. 20), якими були амплітуда трансмембранного струму та вірогідність існування відкритого стану каналу автор нехтує фактом, що у більшості випадків дія досліджених ним лігандів адрено- і холіноергічних рецепторів зводилася до блокування амплітуди струму LCC-каналами або зменшення часу їхнього існування у відкритому стані, що загалом дозволяє охарактеризувати ці

речовини як блокатори різного ступеня спорідненості з каналом (стр. 139). Відтоді, з огляду на певні особливості будови іонопровідних пор вже досліджених каналів у розділі «Обговорення...» ефективного блокування ацетилхоліном провідності LCC-каналів з перинуклеарного боку ядерної мембрани можна було би, наприклад, пояснювати кращим проникненням молекули блокатора в порожнину каналу через ширший за розміром отвір в'їстя каналу, що в класичних моделях іонопровідних пор (A.Marty and A. Finkelstein (1975) Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, J.Gen.Physiol., 65, 515-526) знаходиться з зовнішнього боку мембрани. Також, можна було би приблизно оцінити ефективний розмір отвору пори LCC-каналу за його провідністю та розмір молекул блокаторів, що могло би дозволити пояснювати причину утворення вибіркового ряду цих блокаторів, побудованого за спроможністю зменшувати амплітуду струму LCC-каналом при позитивних потенціалах з перинуклеарного боку, (атропін > платифілін > полікарпін) (стр. 135) за зменшенням збігу між розміром отвору пори і молекули блокатора. Причому, зв'язування молекул цих речовин з LCC-каналом могло відбуватись, наприклад, завдяки позитивному заряду молекули азоту, присутньому у всіх відзначених блокаторів та негативного заряду карбоксильної групи LCC-каналу. Так само, як і в випадку зауваження 1, хоча дисертант є цілком свідомим можливості такого типу обговорення отриманих ним результатів, він в основному залишає його на майбутнє для подальшої перевірки додатковими дослідженнями коли «Встановлення і подальше вивчення структурних особливостей, які забезпечують інгібування LCC-каналів, зможе допомогти вибудувати краще розуміння структури самих LCC-каналів, оскільки молекули модулятора зазвичай є комплементарними регуляторному сайту модульованого білка, такого, як іонний канал.» (стр. 141). У такий спосіб, аналогічно зауваженню 1, автор дещо збіднює розділ «Обговорення» чим іноді робить його схожим на повтори «Результатів» та «Висновків».

3. З огляду на невелику кількість припущень, які могли би логічно поєднати блокувальні спроможності лігандів холіно- та адренорецепторів на LCC-каналах, часто вживаний для деяких речовин проміжний висновок про гетерогенність структури LCC-каналу з різних боків мембрани типу: «...різниця в ефекті карбахоліну залежно від того, з якого боку мембрани його аплікували, може свідчити про те, що структура LCC-каналів також є гетерогенною залежно від сторони мембрани ...» (стр. 69) краще переносити із «Результатів...» в «Обговорення...» і «Висновки».

Також хотілося би поставити дисертанту запитання:

1. Ураховуючи відносно невелику спроможність інструментарію, використаного автором в роботі до змін концентрації задіяних блокувальних речовин (в більшості репрезентативних випадків від 0,5 до 10 ммоль/л) чи розглядає автор в подальших дослідженнях можливість реконструкції LCC-каналів у штучних мембранах з метою полегшення доступу значно більших або менших концентрацій використаних ним або інших речовин до різних боків LCC-каналу для остаточного визначення їхньої блокувальної дії та ступіня спорідненості до каналу?

Висловлені зауваження і запитання мають дискусійний характер та не впливають на загалом позитивну оцінку роботи.

### **Висновок**

Дисертаційна робота Надтоки Сергія Олександровича «Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів» є

актуальною завершеною працею з достатнім об'ємом та рівнем досліджень, науковою новизною результатів, теоретичною та практичною цінністю отриманих даних, об'єктивністю та обґрунтованістю висновків та оформлення.

Представлена Надтокою Сергієм Олександровичем дисертаційна робота на тему «Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів» відповідає усім 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 №44 від 12 січня 2022 року, вимогам щодо оформлення дисертації, затвердженими наказом МОН України №40 від 12 січня 2017 року (зі змінами, внесеними наказом МОН України №759 від 31 травня 2019 року), та відповідає напряму 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».

Офіційний опонент

Провідний науковий співробітник  
відділу нейрохімії Інституту біохімії  
ім. О. В. Палладіна НАН України,  
доктор біологічних наук, старший  
науковий співробітник



Олег ШАТУРСЬКИЙ



Підпис Олега Шатурського  
ЗАСВІДЧУЮ  
Зав. відділом кадрів  
Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна  
національної академії наук України  
18 05 2023 р. 