

РЕЦЕНЗІЯ

кандидата біологічних наук, старшого наукового співробітника

відділу біофізики сенсорної сигналізації

Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Романенка Сергія Вячеславовича

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

Довготривала синаптична пластичність залишається одним з найбільш інтенсивно досліджуваних явищ у нейробиології через її прямий вплив на розуміння консолідації пам'яті, когнітивних функцій та нейродегенеративних захворювань, таких як депресія, хвороба Альцгеймера і навіть хронічний біль. Більше того, нещодавно швидка антидепресивна дія антагоніста NMDA-рецепторів стимулювала інтенсивні дослідження ролі NMDA-рецепторів та синаптичної пластичності в розладах настрою.

Незважаючи на десятиліття досліджень, точні молекулярні механізми, що регулюють індукцію LTD, зокрема кальцій-залежний ендоцитоз AMPA-рецепторів, залишаються недостатньо вивченими. Широкий спектр білків, таких як білковий комплекс TARP/PSD-95, CaMKII, PP1 протеїнфосфатаза 1, кальцинейрин; NSF білок, глутамат-взеємодіючий білок (GRIP), AP2-поліпептидний комплекс, білок PICK1, що взаємодіє з C-кіназою 1 (PICK1) тощо, беруть участь у формуванні LTD, що робить цей процес складним і комплексним, чутливим до багатьох експериментальних факторів, а отже,

ускладнює розшифрування фактичного механізму депресії синаптичної передачі. Проте потенційним і ключовим елементом у процесі ослаблення синаптичних зв'язків є важливий молекулярний провідник – гіпокальцин (HPCA). Цей нейрональний кальцієвий сенсорний білок діє як критичний перемикач, перетворюючи кальцієві сигнали, ініційовані активацією NMDA-рецепторів, у фізичне видалення AMPA рецепторів із синапса, тим самим пригнічуючи синаптичний зв'язок.

Ідентифікація та характеристика HPCA як потенційного ключового медіатора в цьому процесі може заповнити значну прогалину в наших знаннях про синаптичну пластичність, а отже, дослідження HPCA-опосередкованого LTD, є важливою проблемою в нейронауці.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значущість

Це дослідження дозволяє безпосередньо спостерігати за переміщенням нейронального кальцієвого сенсора HPCA до певних дендритних ділянок та зон ендоцитозу під час активації NMDA-рецепторів та індукції LTD у живих нейронах гіпокампу. Попередні дослідження базувалися виключно на непрямих методах, тому візуалізація динамічної поведінки HPCA під час синаптичної пластичності є новим кроком уперед у розумінні природи LTD. Досягнута просторова точність у використаних флуоресцентних методах демонструє накопичення HPCA саме в околицях постсинаптичних щільностей, надає нові деталі про субклітинну організацію механізму LTD.

У роботі представлено комплексний порівняльний аналіз Ca^{2+} -залежних моделей перерозподілу HPCA у різних типах мембран у залежності від вмісту PIP_2 у живих клітинах зі спрощеною морфологічною структурою. Цей підхід надає нові відомості про механізми селективності мембран, що лежать в основі транслокації HPCA, виявляючи, що вміст PIP_2 сам по собі не визначає моделі

перерозподілу в клітинах НЕК 293, тим самим виявляє існування додаткових, раніше не описаних регуляторних факторів.

Дослідження розкриває нову подвійну функціональність НРСА, вперше демонструючи, що значна взаємодія НРСА-АР2В1 існує в дендритних шипиках до активації NMDA-рецепторів. Це відкриття розширює наше розуміння ролі НРСА, виявляючи його участь не тільки в активності-залежній пластичності, але й у конститутивному транспорті синаптичних рецепторів — функції, яка фундаментально розширює біологічне значення НРСА.

Спостереження, що взаємодія НРСА-АР2В1 зберігається після завершення індукції LTD, є імовірно одним з перших доказів ролі НРСА у фазі підтримання синаптичної депресії. Це розширення функції НРСА за межі початкової фази індукції представляє собою принципово нові дані у розумінні механізмів LTD, що свідчить про те, що кальцієві сенсори відіграють постійну роль у підтримці синаптичних модифікацій.

Виявлення взаємодії НРСА-АР2В1 як у дендритних стовбурах, так і в шипиках під час LTD свідчить про більш складну, багатокомпартаментну організацію механізмів синаптичної депресії, ніж вважалося раніше. Це відкриття свідчить про те, що LTD передбачає скоординовані молекулярні події в різних нейронних компартментах, що представляє новий рівень складності в організації синаптичної пластичності.

З'ясовуючи точні молекулярні взаємодії, що лежать в основі LTD, це дослідження забезпечує конкретні мішені для терапевтичного втручання при розладах, пов'язаних із синаптичною дисфункцією. Детальна характеристика динаміки взаємодії НРСА-АР2В1 відкриває нові можливості для розробки цілеспрямованих методів лікування розладів пам'яті та суміжних неврологічних захворювань.

Обґрунтованість та достовірність наукових положень й висновків

У дослідженні використовувалася сучасна система флуоресцентної візуалізації живих клітин, здатна фіксувати динамічні молекулярні взаємодії з високою просторовою та часовою роздільною здатністю. Цей підхід до візуалізації інтегрував кілька методів детекції, що дозволило одночасно відстежувати в режимі реального часу процеси транслокації білків, динаміку мембран та взаємодії між білками. Здатність системи підтримувати життєздатність нейронів протягом тривалих періодів спостереження була вирішальною для відстеження повного часового перебігу фаз індукції та підтримання LTD.

Конфігурація візуалізації забезпечувала субклітинну роздільну здатність, достатню для розрізнення між дендритними відростками та постсинаптичними щільними ділянками, що дозволяло точно локалізувати процеси транслокації HPCA. Застосування мікроскопії FRET забезпечило кількісне вимірювання взаємодій білків HPCA-AP2B1 з нанометровою точністю виявлення близькості. Цей рівень просторової дискримінації був необхідний для ідентифікації специфічного націлювання HPCA на зони ендоцитозу, забезпечуючи анатомічну точність, необхідну для підтримки механістичних висновків про організацію синаптичної пластичності. Включення флуоресцентних маркерів PSD95 забезпечило анатомічні опорні точки для точної субклітинної локалізації - синаптичної ідентифікації та точного вирівнювання подій транслокації HPCA з синаптичними структурами, моніторингу синаптичних структурних змін під час індукції пластичності.

Додаткові експерименти на клітинах НЕК 293 забезпечили спрощене клітинне середовище для ізоляції конкретних аспектів поведінки HPCA, таких як точне маніпулювання рівнями експресії білків та незалежне підтвердження результатів, отриманих з нейронних систем.

Іонофорез спочатку був розроблений як техніка для тривалого місцевого введення речовин. Просторова та часова динаміка вивільнення речовини з

електрода робить цей метод ефективною альтернативою ванному застосуванню, яке передбачає заміну розчину в експериментальній камері. Ця система призначена для полегшення локального введення ліків в окремі нейрони без впливу на сусідні клітини, а також для забезпечення часового контролю, необхідного для індукції LTD. Тривале місцеве іонофоретичне введення NMDA виявилось ефективною стратегією для фармакологічного моделювання довготривалої депресії (LTD) в первинних культурах нейронів гіпокампу щурів.

Для забезпечення надійності висновків були використані надійні статистичні підходи.

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 також входить до колективів виконавців 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, 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 (20/118 частин дисертаційного матеріалу), 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

Роботу проведено на високому технічному рівні, із застосуванням сучасних та адекватних поставленим задачам методик. Втім деякі питання залишаються недостатньо розкритими:

- У проектуванні системи локальної аплікації для з'ясування особливостей розливу краплі діючої речовини (в даній роботі конкретно NMDA) було використано флуоресцентний барвник AlxaFluor 594. Використовуючи флуоресцентний слід від AlxaFluor 594 було визначено просторовий та часовий патерн доданого діючого агента. Здобувач розкрив, що сам процес формування краплі є складним, регулюється принаймні чотирма основними факторами як то дифузія, електрохімічний градієнт, тиск в системі аплікації та ін. Втім, хоча обидві молекули мають порівняний негативний заряд, вибудовуючи відповідні патерни необхідно враховувати молекулярну масу (та в ідеалі - просторові особливості молекули) кожної із молекул: для AlxaFluor 594 це близько 984, в той час як для NMDA це лише 147, тобто використовувана в подальших експериментах молекула в 6 разів легша і відповідно має бути більш рухливою, що впливає на кінцевий патерн концентраційного градієнта як в просторі так і по часу! Більше того,

концентрація використаної в калібрувальному експерименті AlxaFluor 594 була 100 мкМ, в той час як NMDA – 15 мМ, що в 150 більше, і безумовно це є фактором що впливає на патерн зони локальної активації! Чи було це враховано в роботі автора – це питання, що недостатнім чином розкрито в рукописі даної роботи!

- До попереднього питання слідує наступне: чи було проведено аналіз автором, стосовно відповідності використаної часової динаміки прикладання NMDA фізіологічним часовим патернам, що відповідають природньому процесу формування довготривалої пластичності? Порівняльний аналіз із попередніми роботами та зрівняння із альтернативними експериментальними методами розкрито досить поверхово!
- Окремий коментар до рис. 3.1. С: більш детальне роз'яснення чому базові лінії на різних рівнях відносних одиниць.
- У розділі Методів, чомусь питанню статистичного аналізу приділено надзвичайно мало уваги. Варто зважати, що перелік програмних пакетів, що були використані як автоматизовані методи статистичного аналізу є по суті інформацією вторинного типу, адже пакети та програми змінюються із часом, а самі статистичні підходи та алгоритми, самі по собі, також зазнають еволюції та розвитку! Втім саме обґрунтуванню, чому саме ті чи інші статистичні підходи були використані, у роботі описано неповно. Відсутнє роз'яснення доцільності використання тих чи інших метрик як показників, зокрема використання міжквартільного інтервалу в одних місцях та девіаційного розкиду в інших!
- В роботі мало приділено уваги особливості локального іонофоретичного впливу на досліджувані нейрони. Аплікаційна крапля була досить великою щоб покривати не лише частину дендритного дерева, а й сому нейрона, що є малоймовірним процесом за природних умов. Більше того, використана концентрація NMDA – 15 мМ, була достатньою аби повністю активувати відповідні рецептори навіть у *Min zone*. На це варто

зважати з огляду на набагато більші можливості соми значно потужніше ампліфікувати внутрішньоклітинний кальцієвий сигнал! Як наслідок, розвиток і розповсюдження внутрішньоклітинного вільного кальцію від соми в базальну зону дендритного дерева може значно спотворити процес природнього формування довготривалої пластичності.

- В узагальненні результатів та у висновках залишились недостатньо розкриті результати даної роботи, що стосуються електрофізіологічної її частини, зокрема аналіз мініатюрних постсинаптичних подій.
- Видається досить відносно обґрунтований експериментальний дизайн із дослідженням розподілу міnorного фосфоліпиду PIP_2 між різними типами клітинних мембран у загальній структурі даної дослідницької роботи, що імовірно пов'язано із потенційним продовженням даного дослідження в майбутніх роботах автора.

Загальний висновок рецензента

Дане дисертаційне дослідження присвячене вивченню ролі гіпокальцину в індукції довготривалої синаптичної депресії. Автор демонструє глибоке експертне розуміння предметної області та якісно викладає аспекти представленої роботи, показуючи її високу актуальність у контексті інтенсивних сучасних досліджень синаптичної пластичності та прямого зв'язку з розумінням консолідації пам'яті та когнітивних функцій. Наукова новизна роботи заслуговує бути оціненою як фундаментальна, особливо варто підкреслити пряму візуалізацію переміщення HPCA до дендритних ділянок та зон ендоцитозу в живих нейронах, що представляє принципово новий крок вперед порівняно з попередніми дослідженнями, які базувалися виключно на непрямих методах.

Особливо значущим є виявлення подвійної функціональності HPCA - виявлення ролі HPCA у фазі підтримання LTD через збереження взаємодії

НРСА-AP2B1 після завершення індукції, що є один з перших доказів постійної ролі кальцієвих сенсорів у підтримці синаптичних модифікацій, що представляє принципово нові дані у розумінні механізмів LTD.

Методологічна обґрунтованість роботи заслуговує високої оцінки. Особливо відзначається застосування сучасної флуоресцентної візуалізації живих клітин з високою просторово-часовою роздільною здатністю, що інтегрує кілька методів детекції для одночасного відстеження різних процесів в режимі реального часу.

Використання FRET-мікроскопії для кількісного вимірювання білок-білкових взаємодій з нанометровою точністю забезпечує необхідну точність для обґрунтування висновків про організацію синаптичної пластичності. Інноваційне застосування іонофорезу як ефективної альтернативи ванному застосуванню для локального введення препаратів є технічною інновацією даного дослідження, що забезпечує просторовий та часовий контроль, необхідний для індукції LTD.

Дослідження є практично значущим у забезпеченні конкретних мішеней для терапевтичного втручання при розладах, пов'язаних із синаптичною дисфункцією, та відкриття нових можливостей для розробки цілеспрямованих методів лікування розладів пам'яті та суміжних неврологічних захворювань. Детальна характеристика динаміки взаємодії НРСА-AP2B1 може розглядатись як основа для майбутніх терапевтичних розробок.

Дисертаційна робота в повному обсязі 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 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. Робота Бориса Оліфірова пройшла

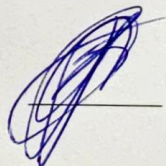
перевірку на плагіат, що підтверджує дотримання автором принципів академічної доброчесності.

Автор продемонстрував в даній роботі глибоке експертне розуміння складності предметної області, про що свідчить винятково висока якість роботи та її повна відповідність найвищим стандартам наукових досліджень, що дозволяє рецензенту визнати роботу як значний внесок у сучасну нейробіологію, який заслуговує на найвищу оцінку наукової спільноти.

Рецензент

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
відділу біофізики сенсорної сигналізації
Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

НАН України



Сергій РОМАНЕНКО

