

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу

Надтоки Сергія Олександровича

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

подану на спеціалізовану вчену раду PhD 13029

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України

на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

Іонні канали плазматичної мембрани збудливих клітин, таких, як досліджувані автором нейрони, на сьогодні визначені як найбільш важливий клас молекулярних мішеней для лікування різних захворювань, але при цьому фармакологічні модулятори спряжених з G-білками рецепторами залишаються найбільшою групою ефективних лікарських засобів. Ця диспропорція пояснюється тим, що сучасні знання про структурно-функціональні взаємодії іонних каналів все ще залишаються досить фрагментарними і неповними. Особливо це стосується іонних каналів, які експресовані у внутрішньоклітинних структурах, зокрема це іонні канали мітохондрій, лізосом, ендо(сарко)плазматичного ретикулуму і ядерної мембрани. Відомо, що інозитол-трисфосфатні та ріанодинові рецептори, а також деякі типи катіонних TRP каналів, що локалізовані у цих мембранах, відіграють суттєву роль у процесах внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації шляхом, зокрема, вивільнення Ca^{2+} із перинуклеарного простору та сполученого із ним люмену ендоплазматичного ретикулуму до цитозолу та всередину ядра, проте не повністю

охарактеризованою залишається група катіонних каналів високої провідності (LCC-канали), фармакологічні і біофізичні властивості яких були досліджені автором дисертаційної роботи. Слід підкреслити, що молекулярна будова LCC-каналів залишається невідомою, а без цього пошук специфічних лігандів цих білків може носити лише суто емпіричний характер методом спроб і помилок. У цьому сенсі представлена дисертаційна робота Надтоки Сергія Олександровича, що присвячена дослідженню впливу фізіологічно активних речовин самої різної будови на ці канали, є закономірним кроком на шляху до розв'язання наведеної проблеми, а саме цільової фармакологічної регуляції активності LCC-каналів та майбутньої перевірки гіпотези про їх роль у створенні компенсаторного катіонного протитоку іонам кальцію у процесі їх вивільнення із перинуклеарного простору.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість

У дисертаційній роботі Надтоки С.О. було вперше досліджено дію на LCC-канали широкого спектру фізіологічно активних сполук залежно від їхнього класу, із аналізом і порівнянням впливу агоністів та антагоністів нікотинових холіноцепторів, мускаринових холіноцепторів, а також адреноцепторів, тоді як попередні дослідження з цієї теми були акцентовані на вивченні дії головним чином н-холіномодуляторів. Вплив на LCC-канали ядерної мембрани нейронів Пуркінє досліджуваних у роботі речовин (ацетилхолін, карбахолін, мекаміламін, панкуроній, векуроній, атропін, платифілін, пілокарпін, норепінефрин, епінефрин, пропранолол, ізопреналін) раніше не був описаний, окрім цього, для низки сполук (а саме для ацетилхоліну, карбахоліну, мекаміламіну, атропіну, платифіліну та пілокарпіну) було вивчено також особливості впливу на ядерні LCC-канали нейронів Пуркінє залежно від конфігурації застосування (тобто при додаванні хімічних сполук у ванночку з

досліджуваним ядром чи включення у піпеточний розчин), що для вказаних речовин також не було проведено до цього. Теоретична значимість отриманих результатів полягає у розширенні розуміння фундаментальних аспектів функціонування та регуляції ядерних високопровідних катіонних каналів. Крім цього, отримані дані дозволяють здійснювати фармакологічну модуляцію активності LCC каналів, що має потенційну практичну користь.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків

Дисертаційне дослідження Надтоки С.О. базується на методі петч-клемп реєстрацій трансмембранних іонних струмів у конфігурації “nucleus-attached”, що є аналогом конфігурації «cell-attached» у дослідженнях іонних каналів плазматичної мембрани, з подальшим аналізом амплітуди струму крізь окремі LCC-канали та ймовірності їх перебування у відкритому стані (P_o). Це є найбільш прямим і адекватним методом для дослідження функції іонних каналів, який, на відміну від реєстрацій інтегральних струмів, дозволяє проводити такі дослідження на найбільш фундаментальному рівні і, таким чином, отримувати прямі дані щодо провідності, селективності і ймовірності знаходження іонного каналу у відкритому стані, як це і було зроблено у даній роботі

Кожна стадія експериментальної роботи ретельно описана, що забезпечує відтворюваність досліджень, а розділ «Матеріали та методи» доповнений ілюстративною схемою. Крім того, отримані результати проаналізовано із застосуванням адекватних статистичних методів аналізу. Викладення результатів є логічним і послідовним, а висновки та наукові положення є належно обґрунтованими, достовірними, і витікають безпосередньо із отриманих даних. Висновки роботи загалом відповідають її меті і поставленим завданням. Робота виконана на високому науково-методичному рівні, що також підтверджується успішною апробацією результатів на наукових конференціях та публікаціями в українських та закордонних фахових виданнях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

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

Структура, обсяг та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Загальний обсяг дисертаційної роботи становить 171 сторінку з урахуванням анотації та списку використаних джерел. Структура роботи є класичною для дисертаційних робіт представлених для здобуття наукового ступеня доктора філософії, та включає анотацію, зміст, перелік умовних позначень, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів, результати досліджень, обговорення, висновки та список використаних джерел (165 найменувань). Дисертація є добре проілюстрованою, наведені рисунки і таблиці дають повне уявлення про значний обсяг і високу якість експериментальних даних. Результати дисертаційної роботи були опубліковані у 5-ти статтях в українських та закордонних фахових виданнях, що індексуються у наукометричній базі даних Scopus та належать до 3-го та 4-го квартилей за класифікацією Scimago Journal & Country Rank. Також результати є апробованими на 10-ти наукових конференціях. Дотримання принципів

академічної доброчесності підтверджено результатами перевірки дисертаційної роботи на плагіат.

Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи

При ознайомленні з роботою виникли деякі запитання та зауваження, які носять переважно методичний та дискусійний характер, а саме:

1. В анотації роботи не зазначені концентрації діючих на LCC-канал речовин, без чого неможливо оцінити, наскільки специфічними були фармакологічні ефекти тих чи інших сполук.
2. В огляді літератури зазначається наступне: «іонні канали ядерної мембрани можуть забезпечувати підтримання різниці потенціалів між нуклеоплазмою та цитоплазмою». Яким чином може існувати різниця потенціалів, коли у ядерній мембрані є близько 3000 ядерних пор великого діаметру, адже разом вони формують високопровідний електричний шунт між нуклеоплазмою та цитоплазмою?
3. Зазначається, що струми реєстрували із часовою дискретизацією 200 мкс, тобто частота оцифровки сигналів була 5 кГц, але не менш важливим параметром, від якого залежить роздільна здатність детекції переходів між відкритими і закритими станами іонних каналів, це частота фільтру, яка не зазначена. Тому виникає питання щодо вибору цього параметру, а саме «при визначенні P_o були ігноровані зміни між закритим та відкритим станами, тривалість яких становила менше 10 мс». Яким чином було визначено, що роздільна здатність становить саме 10 мс? Крім того, для кінетики конформаційних змін у білках, що формують іонні канали, це занадто велике значення, адже типові значення знаходяться у суб-мілісекундному діапазоні.
4. Визначення ймовірності знаходження іонного каналу у відкритому стані (P_o) за наявності більше, ніж одного, іонного каналу у фрагменті мембрани – це технічно складна проблема, адже у цьому разі аналітичні алгоритми програми

Clampfit розраховують добуток кількості активних каналів на P_o , тобто NP_o , а для отримання величини P_o потрібно ввести N – кількість каналів. Як вона визначалася?

5. Молекула ацетилхоліну має позитивний заряд, отже вона не може проникати через біологічні мембрани. Яким чином міг би діяти ацетилхолін при його додаванні до ванночки, як пояснюється у роботі на с. 61 шляхом взаємодії з внутрішньоядерною стороною мембрани? Аналогічне питання виникає і стосовно дії карбахоліну.

6. Стандартною концентрацією діючих речовин у роботі було обрано 1 мМ, що у деяких випадках викликає сумніви щодо специфічності їх дії. Наприклад, атропін інгібує різні підтипи мускаринових рецепторів з величинами IC_{50} у межах 0,4 -5 нМ, тому у цьому випадку речовину для блокування LCC-каналів прикладали у концентрації, яка на 5-6 порядків перевищує таку, що блокує мускаринові ацетилхолінові рецептори.

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

Висновок офіційного опонента

Дисертаційна робота Надтоки Сергія Олександровича «Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів» є самостійно проведеним, оригінальним і завершеним дослідженням, яке характеризується новизною, високим методичним рівнем, містить добре обґрунтовані результати і висновки, сприяє вирішенню актуальної наукової проблеми та має теоретичну і практичну цінність.

Представлена Надтокою Сергієм Олександровичем дисертаційна робота на тему «Модуляція високопровідних катіонних каналів ядерної мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів лігандами адренергічних і холінергічних рецепторів»

відповідає 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», вимогам до оформлення дисертації, затвердженим наказом МОН України від 12 січня 2017 року №40 (зі змінами, внесеними наказом МОН України від 31 травня 2019 року №759), 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, а її автор заслуговує на присудження йому 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

