

ВИСНОВОК

наукового керівника д.б.н., проф., завідувача відділу біофізики сенсорної
сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця

Білана Павла Володимировича

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

Оліфіров Б.О. у 2021 році закінчив Київський Академічний Університет за спеціальністю «105 – Прикладна фізика та наноматеріали» та того ж року вступив до аспірантури Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України у відділ сенсорної сигналізації. Борис розпочав роботу у нашому відділі ще навчаючись в магістратурі та продовживши дослідження вже навчаючись в аспірантурі. За тривалий час роботи в нашому відділі впродовж останніх 6 років Борис набув значного рівня наукових компетенцій. Опанував численні експериментальні методики, включно із сучасними підходами у молекулярній генетиці, візуалізації живих клітин, та електрофізіології. Борис сам залучав і розвивав нові методи отримання і обробки результатів, а також запровадив декілька нових експериментальних підходів що раніше не використовувались в роботі нашого відділу. Він значною мірою розвинув експериментальне обладнання, що використовується зараз як в його дослідженнях, так і в роботах інших груп нашого відділу. Під час виконання дисертаційної роботи Борис самостійно планував та проводив власні досліді і керував дослідженнями бакалаврів і магістрів, з якими він працював. Окремо варто зазначити високу вмотивованість та ініціативність здобувача,

здатність до самостійного планування досліджень, подальшого аналізу та презентації результатів.

Впродовж навчання в аспірантурі Борис також активно працював більше як з п'ятьма студентами, які проходили практику в межах нашого відділу. Наставництво включало як допомогу в опануванні експериментальних підходів молодими дослідниками, так і активну участь в обговоренні отриманих результатів, сумісній підготовці тез конференції та рецензування дипломних робіт. Загальний рівень знань та навичок Бориса **повністю відповідає восьмому рівню Національної рамки кваліфікації** та **освітньо-наукова програма виконана** здобувачем в повному обсязі.

Одним із ключових вторинних посередників в нейронах виступають Ca^{2+} , і відповідними подальшими ланками сигналізації виступають численні білки, що здатні зв'язувати ці йони. Серед них варто виокремити сімейство нейронних кальцієвих сенсорів, представником яких є гіпокальцин (hippocalcin/HPCA). До особливостей будови та функціонування HPCA належить наявність активного міристильного перемикача. Цей механізм дозволяє білку Ca^{2+} -залежним чином вбудовуватись до ліпідних мембран, оскільки залишок міристинової кислоти на N-кінці вивільняється з гідрофобної кишені лише у Ca^{2+} -зв'язаному стані. Попри те, що HPCA є одним з найбільш високо експресованих буферів Ca^{2+} в нейронах і у гіпокампі поступається концентрацією лише кальмодуліну, він лишається надзвичайно мало вивченим. Наявні дослідження розглядають HPCA як важливу ланку сигналізації в численних формах нейронної пластичності. Відомо, що HPCA безпосередньо залучений до регуляції повільної постгіперполяризації (slow afterhyperpolarisation/sAHP), різновиду короткотривалої нейронної пластичності що регулює максимальну можливу частоту активності нейронів. Також відома потенційна роль HPCA в регуляції NMDA-рецептор залежної довготривалої синаптичної депресії (long-term depression/LTD). Цей механізм полягає у можливій взаємодії із β -субодиницею комплексу адаптерних білків 2 (AP2B1). Стабілізація AP2B1 на мембрані через взаємодію із HPCA може

сприяти ініціації клатрин-опосередкованого ендоцитозу (clathrin-mediated endocytosis/CME) AMPA-рецепторів впродовж індукції LTD. Додатковим свідченням, що дозволяє припустити участь НРСА у регуляції CME, є підтверджена висока спорідненість до мінорного фосфоліпіда плазматичної мембрани — фосфатидилінозитол-4,5-біфосфата (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate/ PIP_2), що також є критичним у регуляції CME. Також відомо, що точкові мутації в гені *Hrsa* асоційовані із розвитком важкого неврологічного розладу, первинної ізольованої дистонії 2 типу (DYT2). Актуальні дослідження впливу DYT2-асоційованих мутацій на біофізичні властивості НРСА показали, що мутантні форми білка мають погіршену здатність до олігомеризації та суттєво меншу афінності до Ca^{2+} . Зважаючи на дуже високі рівні експресії НРСА в структурах гіпокампа розглядається, що можливою ланкою молекулярного патогенезу DYT2 може виступати не тільки порушення в конкретних сигнальних каскадах, але й загальна пертурбація буферної системи Ca^{2+} в нейронах. На жаль, не зважаючи на беззаперечну роль Ca^{2+} як вторинного посередника в нейронах, нейронні кальцієві сенсори, і зокрема НРСА, залишаються мало вивченими й переважна частка висновків щодо сигналізації НРСА спирається на непрямі фізіологічні та біохімічні дослідження. **Актуальність дисертаційного дослідження** полягає в глибших дослідженнях НРСА як вторинного посередника в кальцієвій сигналізації однієї з основних форм довготривалої синаптичної пластичності, NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії. А використання сучасних підходів візуалізації живих клітин дозволила дослідити процеси локальної просторово-часової сигналізації НРСА у відповідь на активацію синаптичних рецепторів на рівні, що до цього не зустрічався в відомих дослідженнях. **Метою роботою** було встановити участь НРСА в процесі розвитку довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії в нейронах гіпокампа щура. Відповідно до мети були сформульовані завдання дисертаційного дослідження: адаптувати й валідувати методику іонофоретичного прикладання

фармакологічних препаратів для тривалих локальних прикладань NMDA та фармакологічного моделювання довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії в первинній культурі нейронів гіпокампа щура; ідентифікувати потенційні сайти HPCSA-індукованого ендоцитозу, опосередкованого довготривалою активацією NMDA рецепторів в дендритному дереві та шипиках нейронів гіпокампа; визначити наявність взаємодії між HPCSA та AP2B1 в процесі розвитку довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії.

Беззаперечна **наукова новизна дисертаційного дослідження** полягає як в методичній, так і в фундаментальній площинах. Було розроблено новий підхід для експериментального моделювання фармакологічно індукованої довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії. З використанням цього методу було вперше проведено прямі спостереження в живих нейронах гіпокампа за сигналізацією HPCSA на рівні окремих структур дендритного дерева у відповідь на різні патерни активації NMDA-рецепторів та впродовж індукції довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії й продемонстровано потенційну білок-білкову взаємодію з AP2B1 з використанням Фьорстеровського резонансного перенесення енергії.

Застосовуваність розробленого підходу тривалих локальних іонофоретичних прикладань фармакологічних препаратів, що є ефективною та економічно вигідною альтернативою заміні розчину у всьому об'ємі експериментальної камери (bath-application) є **прямим практичним значенням дисертаційного дослідження** що може бути використано широким колом дослідників в галузі нейронаук та біофізики. Водночас **теоретичне значення** роботи полягає в поглибленні нашого розуміння механізмів трафіку синаптичних рецепторів та сигналізації довготривалої синаптичної пластичності, що спонукає до подальших досліджень HPCSA на цій царині. А поєднання цих знань із відомостями про залученість HPCSA до молекулярного патогенезу неврологічних захворювань відкриває подальші

перспективи до розробки методів терапії дистонії із використанням біофізичних та генно-інженерних підходів.

Здобувач активно залучений до виконання **наукових програм та грантів**: наукова тематика відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (№0124U001556). Також дисертант входить до колективів виконавців двох грантів тематики яких безпосередньо дотичні до теми дисертаційного дослідження: «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).

Борисом опрацьовано значний масив наукових джерел за тематикою дисертаційного дослідження. Отримані результати відповідають сучасним науковим уявленням в галузі досліджень синаптичної передачі та біофізики кальцій-зв'язуючих білків, використано актуальні підходи для математичного і статистичного аналізу результатів. **Положення та висновки, отримані автором у процесі дослідження, належним чином аргументовані та науково обґрунтовані.** Правдивість сформульованих у дисертації наукові концепції та висновки ґрунтуються на результатах оригінальних експериментальних досліджень, аналіз і обговорення отриманих результатів викладені логічно і послідовно. **Матеріали дисертації висвітлені** здобувачем в 12 наукових працях, з яких 2 статті в наукових журналах категорії А індексованих в базах Scopus/WoS (Q2 та Q4 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 10 тез представлених на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів. Здобувач

безпосередньо брав участь в концептуалізації наукових ідей, проведені експериментальної роботи, обробці результатів та підготовці до публікації зазначених наукових праць.

Дисертаційна робота повністю відповідає вимогам до оформлення дисертацій, які затверджені наказом МОН України № 40 від 12.01.2017 року зі змінами та доповненнями, внесеними наказом МОН України № 759 від 31.05.2019 року та 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. Варто зазначити високий рівень викладення матеріалів дисертаційного дослідження, **вичерпний зміст роботи, і стилістичну** гармонійність наукового тексту. За досвідом роботи з Борисом переконаний у дотриманні ним самих високих стандартів **академічної доброчесності та відсутності їх порушень** в рамках роботи над дисертаційним дослідженням, що додатково засвідчується результатами перевірки на академічний плагіат з використанням програми Unicheck.

Вважаю, що під час виконання дисертаційної роботи Борис Оліфіров. зарекомендував себе як компетентний, креативний, мотивований і працьовитий фахівець, здатний як до самостійної наукової діяльності, так і до керування колективом науковців. Засвідчую, що дисертаційна робота Оліфірова Бориса Олексійовича на тему «Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії» є повноцінним оригінальним науковим дослідженням. Актуальність обраної тематики та високий рівень виконання відповідають встановленим вимогам до дисертаційних робіт на здобуття ступеня докторів філософії, тому рекомендую роботу до офіційного захисту на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія.

Науковий керівник:

доктор біологічних наук,

професор,

завідувач відділу

біофізики сенсорної сигналізації

Інституту фізіології

ім. О. О. Богомольця НАН України

 Павло БІЛАН

