

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу
Дромарецького Андрія Валентиновича
«Порушення Ca_{2+} -залежної сигналізації гіпокальцину як механізм первинної
аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії»
подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.02 «Біофізика»

Актуальність проблематики дисертаційного дослідження

Кальцієва сигналізація в нейронах регулює багато клітинних функцій, зокрема за участі нейронних чутливих до Ca^{2+} білків, або так званих кальцієвих сенсорів (NCS), які у свою чергу впливають на активність різних ефекторів, таких як іонні канали, насоси та ензими. Мутації генів, що кодують ці білки, можуть відігравати важливу роль у нейронних дисфункціях та захворюваннях нервової системи. Первинна дистонія – це руховий синдром, що супроводжується мимовільними м'язовими скороченнями та аномальними позами. Морфологічних аномалій у мозку таких пацієнтів немає, але виявлені функціональні відхилення у корі, смугастому тілі, мозочку, таламусі, стовбурі мозку та гіпокампі. Зокрема було показано, що гіпокамп відіграє важливу роль у розвитку дистонії.

Дослідження пацієнтів із DYT2-дистонією показали мутації в гені HPCA, який кодує білок гіпокальцин (HPCA). Цей білок регулює нейрональну активність через кальцій-залежну транслокацію до плазматичної мембрани, що пригнічує електричну активність нейронів шляхом активації струму повільної гіперполяризації (sАНР). Проте механізми регуляції sАНР залишаються маловивченими. Останні дослідження припускають, що sАНР пов'язаний із взаємодією кальцієвих каналів, ріанодинових рецепторів та калієвих каналів. Мутації HPCA (T71N та N75K) можуть порушувати приєднання Ca^{2+} , що блокує транслокацію білка та послаблює гальмування, спричиняючи надмірну збудливість нейронів. Це підтверджує гіпотезу про участь порушеної сигналізації HPCA в розвитку дистонії DYT2, що потребує подальших детальних досліджень та нових методів оцінки біофізичних властивостей мутантних білків.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретична та практична значимість

У цьому дослідженні на його першому етапі вперше було розроблено методику вимірювання концентрації флуорофорів у різних типах поодиноких клітин, що дозволяє більш точно аналізувати біохімічні процеси всередині клітин.

Саме цей новітній методичний підхід дозволив автору роботи надалі отримати низку нових наукових результатів.

Одним із ключових відкриттів стало визначення механізму, через який ці мутації викликають порушення кальцієвої сигналізації білка гіпокальцину. Автор встановив, що в одного з мутантних варіантів гіпокальцину знижується спорідненість (афінітет) до іонів кальцію. Це означає, що білок не може ефективно зв'язувати кальцій, а це, в свою чергу, перешкоджає його нормальній транслокації до цитоплазматичної мембрани. Оскільки цей процес є критично важливим для правильної взаємодії білка з мембранними комплексами та регуляції нейронної активності, його порушення призводить до функціональних змін у клітинах.

Важливим наслідком цього порушення є значне підвищення збудливості нейронів. Відомо, що нормальна кальцієва сигналізація є ключовим механізмом, який регулює рівень збудливості нервових клітин. Якщо цей баланс порушується, нейрони можуть стати надмірно активними, що, ймовірно, є однією з основних причин розвитку симптомів первинної дистонії типу DYT2.

Окрім опису механізму цього патологічного процесу, автор даної роботи також пропонує можливий спосіб його корекції. В експериментах на поодиноких клітинах та шляхом комп'ютерного моделювання автор показав, що генетичні маніпуляції, спрямовані на підвищення експресії дикого (нормального) типу гіпокальцину в нейронах, можуть мати позитивний ефект. Зокрема, підвищення рівня нормального гіпокальцину в аномально збуджених низхідних нейронних шляхах сприяє відновленню процесу повільної післягіперполяризації. Цей процес є важливим для регуляції нейронної активності, оскільки він допомагає нейронам адаптуватись до надмірного вхідного сигналу збудження, а це у свою чергу запобігає надмірній активності нейронів.

Таким чином, автор не лише пояснює біофізичні механізми, які лежать в основі порушень роботи мутантних варіантів гіпокальцину асоційованого з первинною дистонією типу DYT2, але й пропонує потенційний підхід до її лікування. Якщо вдасться розробити терапевтичні методи, що будуть ефективно збільшувати рівень експресії дикого типу гіпокальцину в уражених нейронах, це може стати основою для нових стратегій лікування цього захворювання. Отже, отримані результати мають важливе значення не тільки для більш повного розуміння функції гіпокальцину у нервових клітинах, але вони також відкривають шлях для подальших досліджень молекулярних механізмів неврологічних порушень і розробки інноваційних підходів до їхньої корекції.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Для досягнення поставленої мети дисертаційного дослідження Дромарецький А.В. використав цілий комплекс комплементарних методів, які загалом відповідають найбільш сучасним вимогам у галузі дослідження роботи кальцій-чутливих білків та мембранних струмів, тобто проведення дослідження поетапно від експресії екзогенних білків з флуоресцентними мітками шляхом трансфекції, реєстрації їх транслокації методами флуоресцентної мікроскопії, електричної стимуляції активності нейронів для підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію з використанням метода петч-клемп або з використанням фотодеструктивних хелаторів цих іонів, а також методи комп'ютерного моделювання активності нейронів та нейронних мереж з внесеними врахованими порушеннями, що відповідають хворобі.

Варто відмітити, що всі використані методи детально описані і проілюстровані. Отримані результати були адекватно проаналізовані з використанням відповідних статистичних тестів. Результати дослідження пройшли належну апробацію шляхом їх представлення на 4 наукових конференціях.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт структурної лабораторії молекулярної біофізики відділу загальної фізіології нервової системи (з 22.05.2017 - відділ молекулярної біофізики, з 05.10.2023 відділ біофізики сенсорної сигналізації) Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних проектів/робіт: «Вивчення генетичнодетермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012–2016 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2018 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0113U007273), «Сигналізація нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2019–2023 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0118U007345), «Вплив нейромедіаторів на сигналізацію нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2024-2027 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0124U001556).

Структура, обсяг, зміст та повнота викладення матеріалів дисертаційної роботи

Обсяг роботи становить 154 сторінки з урахуванням анотації та списку використаних джерел. Робота містить наступні основні розділи: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результати, обговорення результатів, висновки, список використаних джерел.

Розділ огляд літератури викладений на 19 сторінках та містить пункти, що розкривають відомості про хворобу первинну автосомно-рецесивну дистонію, особливості функції гіпокальцина, механізми утворення та керування струмом повільної пост-гіперполяризації та відомий взаємозв'язок даного білка з патогенезом первинної автосомно-рецесивної дистонії. Загалом в роботі опрацьовано 153 наукових джерел фахової літератури, серед яких приблизно 10% опублікованих за останні 6 років. Огляд літератури показує глибину обізнаності здобувача з даною тематикою дослідження, а також здатність здобувача до критичного системного аналізу та узагальнення наукової літератури. Отримані результати проілюстровані на 90 рисунках і у 4 таблицях, які демонструють їх велику кількість і високу якість.

Результати дослідження опубліковані у 5 статтях у фахових журналах, з яких три статті в журналах першого квартилю Q1 на момент публікації за класифікацією «Scimago Journal & Country Rank». Додатково результати були представлені у вигляді доповідей на 4 вітчизняних та міжнародних наукових конференціях.

Питання, дискусійні положення і зауваження до дисертаційної роботи

При ознайомленні з даною роботою виникли деякі запитання та зауваження, а саме:

1. У роботі зазначається, що (цитую) «Механізми, за допомогою яких зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у нейронах можуть регулювати ці функції, в більшості випадків забезпечуються за допомогою невеликих проміжних універсальних або спеціалізованих нейронних кальцієвих сенсорних білків (Neuronal Ca²⁺ Sensor (NCS) proteins). Саме ці білки в подальшому регулюють активність ефекторних білків, таких як канали, насоси та ензими». Чи не є це певним перебільшенням ролі NCS, зокрема у порівнянні з ролью більш універсального і широко експресованого у різних типах клітин сенсору кальцію, а саме кальмодуліну? Відомо, що у нейронах кальмодулін відіграє важливу роль у процесах синаптичної пластичності та регуляції експресії генів. Крім того, не варто ігнорувати і той факт, що іони кальцію можуть безпосередньо зв'язуватись з багатьма

ефекторами, такими як іонні канали (наприклад VK_{Ca} канали, ріанодинові рецептори внутрішньоклітинних кальцієвих депо, IP_3 рецептори Ca^{2+} депо також як активуються, так і інактивуються іонами кальцію), ензими (наприклад, протеїнкіназа С-альфа також має С2 домени, з якими зв'язуються іони кальцію).

2. З цього виникає більш загальне питання - у чому саме полягає важлива та *специфічна* роль гіпокальцину у нервовій системі, зокрема у порівнянні з іншими класами NCS білків?
3. В огляді літератури є деякі положення, які потребують більш детальних пояснень. Зокрема, «В усіх випадках гіперполяризація утворюється за рахунок вихідного K^+ -струму проти напрямку поля, але завдяки дифузії через провідність певних пасивних, але керованих каналів». Що означає проти напрямку поля (більш зрозуміло було б написати за електрохімічним градієнтом) і про які саме пасивні, але керовані канали іде мова? Якщо це канали родини K_{2P} , то варто було б визначити ці канали не як пасивні, а як потенціал-незалежні К канали, що відрізняє їх від більшості інших типів калієвих каналів, які є потенціал-керованими каналами.
4. Чому досліджувались нейрони гіпокампу саме новонароджених щурів? Якщо для цього були якісь міркування у контексті онтогенезу, то це варто було б пояснити. Відомо, що первинна аутосомно-рецесивна ізольована дистонія проявляється у віці середнього дитинства або навіть у підлітковому віці, інколи навіть у дорослому віці, тому і виникає таке питання.
5. У розділі 2.11 зазначається, що «Кількість та тривалість УФ-спалахів були обрані для досягнення суттєвого збільшення $[Ca^{2+}]_i$ і для майже повного керованого вивільнення Ca^{2+} зв'язаного NPEGTA». У наших експериментах у залежності від кількості та інтенсивності УФ-спалахів виникала часткова або навіть повна інактивація потенціалзалежного кальцієвого струму. Тому виникає питання – чи враховувались такі можливі побічні ефекти ультрафіолетового опромінення клітин і чи проводились якісь контрольні експерименти?
6. Дуже цікавою і новою концепцією дослідження є положення про те, що транслокація НРСА є фільтром низьких частот відносно динаміки внутрішньоклітинного кальцію. Іншими словами, гіпокальцин є своєрідним інтегратором кальцієвих сигналів. Механістично це можна було б пояснити швидкою дисоціацією іонів кальцію, отже для насичення сайтів зв'язування кальцієм потрібне повторне підвищення його концентрації. Але таке пояснення протирічить тому, що, як відомо, напівмаксимальна активація гіпокальцину іонами кальцію відбувається вже при його концентрації 300 нМ,

а повна активація гіпокальцину відбувається при 800 нМ $[Ca^{2+}]_i$. Таким чином, афінитет гіпокальцину до Ca^{2+} є досить високим, і отже константа швидкості дисоціації Ca^{2+} не може бути настільки високою, щоб відбувалась якась суттєва інтеграція кальцієвих сигналів у часі. Тому виникає питання – як саме працює такий запропонований у роботі біологічний фільтр низьких частот у контексті високого афінитету гіпокальцину до іонів кальцію?

7. З таких міркувань витікає наступне питання стосовно того, що зараз велика увага приділяється локальній кальцієвій сигналізації, мікродоменам, де $[Ca^{2+}]_i$ може досягати мікромольних концентрацій, тобто може відбуватись повне насичення зв'язування кальцію гіпокальцином. Чи відома роль гіпокальцину у таких сигнальних мікродоменах (макромолекулярні комплекси, або сигналоплекси, Ca спалахи (Ca sparks) тощо) і чи не могло б це пояснити принаймні деякі аспекти досліджуваної у цій роботі проблематики?
8. Статистичний аналіз даних (розділ 2.13) передбачає їх нормальний розподіл, але не зазначено чи проводились відповідні тести на нормальність розподілу даних перед тим, як проводити параметричні тести.

Висловлені зауваження і запитання носять переважно дискусійний характер, і вони не впливають на загалом високу позитивну оцінку цього наукового дослідження.

Висновок офіційного опонента

Дисертаційна робота Дромарецького Андрія Валентиновича «Порушення Ca^{2+} -залежної сигналізації гіпокальцину як механізм первинної аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії» є самостійно проведеним, оригінальним і завершеним дослідженням, яке спрямовано на вирішення актуальної наукової проблеми і яке містить нові, науково обґрунтовані дані, положення і висновки, що мають теоретичну і практичну цінність.

Виходячи з актуальності, об'єму та рівня досліджень, наукової новизни результатів, теоретичної та практичної цінності отриманих даних, об'єктивності та обґрунтованості висновків та оформлення дисертаційна робота Дромарецького Андрія Валентиновича «Порушення Ca^{2+} -залежної сигналізації гіпокальцину як механізм первинної аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії» повністю відповідає вимогам «Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук» затвердженого постановою Кабінету міністрів України №1197 від 17.11.2021 зі змінами внесеними згідно з Постановою Кабінету міністрів України

№ 502 від 19.05.2023, та Наказів МОН України № 40 від 12.01.2017 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» і № 1359 від 13.12.2021 «Про затвердження Положення про спеціалізовану вчену раду з присудження наукового ступеня доктора наук», а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальності 03.00.02 - «біофізика».



Офіційний опонент
завідувач кафедри біофізики та нейробіології
Навчально-наукового центру «Інститут біології та
медицини» Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
доктор біологічних наук, професор
Олександр ЖОЛОС

