

## ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертаційну роботу Болдирєва Олексія Ігоровича

“ЕКСПРЕСІЯ ТА ФУНКЦІЯ НИЗЬКОПОРОГОВИХ КАЛЬЦІЄВИХ КАНАЛІВ У  
ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ЩУРІВ В ОНТОГЕНЕЗІ ТА В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ  
МОДЕЛІ АБСАНСНОЇ ЕПІЛЕПСІЇ”

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю

03.00.02 – біофізика

Останнім часом низькопорогові потенціалкеровані кальцієві канали (НПКК), що кодуються трьома генами – *Casnalg*, *Casnalh* і *Casnali*, привертають до себе все більше уваги, як важливі чинники патологічних станів людини. Цікаво, що ці канали диференційовано представлені в багатьох типах клітин по всьому організму людини і ссавців, однак всі одночасно вони можуть бути присутніми лише у нейронах головного мозку. Той факт, що Т-канали мають найменшу провідність щодо іонів кальцію серед усіх ПККК, свідчить на користь їх участі у більш тонкій регуляції кальційзалежних клітинних процесів, порівняно з іншими джерелами внутрішньоклітинного кальцію, а саме в тонкій регуляції мембранного потенціалу клітин та ритмогенезі в мозку та серці та в постачанні іонів кальцію в клітину як вторинних посередників, що беруть участь у регуляції відкриття кальцієвого депо ендоплазматичного ретикулуму, стимуляції синаптичної передачі, активації експресії генів тощо. Таким чином, вивчення цих каналів є вкрай важливим для розуміння внутрішньоклітинної механіки та побудови моделі впливу іонів кальцію на молекулярні процеси в клітині в нормі та в разі патологічних станів.

Дисфункція НПКК в значній мірі визначає етіологію таких патологічних станів як епілепсія, біль, серцево-судинні захворювання, рак адже мутації в

генах Т-каналів корелюють з такими захворюваннями як епілесія з абсансами, патологічний біль, деякі види раку.

З огляду на зазначене актуальність теми дисертаційної роботи не викликає сумніву.

Дисертаційну роботу Болдирева О.І. виконано у відповідності до основного плану науково-дослідних Міжнародного центру молекулярної фізіології НАН України.

В процесі виконання роботи автором отримано низку пріоритетних даних, а саме: аналізом експресії мРНК низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі на різних етапах онтогенезу встановлено, що різні субодиниці кальцієвих каналів Т-типу змінюють свою експресію в процесі розвитку організму щура; встановлено зміни експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів на рівні мРНК і білка у соматосенсорній корі щурів зі спонтанними абсансами, зокрема збільшення кількості мРНК і білка каналу  $Ca_v3.1$  у соматосенсорній корі щурів лінії WAG/Rij і пов'язано це збільшення з абсанс-епілептичним фенотипом; вперше виявлено посттранскрипційну регуляцію мРНК низькопорогового кальцієвого каналу  $Ca_v3.2$  за допомогою мікроРНК gno-miR-1 в корі головного мозку та таламусі щура.

Отримані результати можуть бути використані для більш детального аналізу біофізичних і молекулярних механізмів, що лежать в основі залежних від віку особливостей регуляції кальцію в нейронах таламусу, а також патогенезу абсансної епілепсії. Крім того, дані щодо зміни експресії низькопорогових кальцієвих каналів розширюють уявлення про їхню роль у формуванні нервової системи. Отримані результати також можуть бути враховані при розробці терапевтичних засобів лікування патологій, пов'язаних з гіперактивністю низькопорогових кальцієвих каналів.

Достовірність наукових положень, що виносяться на захист, базується на великому масиві одержаних експериментальних даних.

Роботу побудовано за традиційною для дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук схемою.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, експериментальних результатів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 108 сторінках стандартного машинописного тексту. Вона містить 24 рисунки та 1 таблицю. Список використаної літератури охоплює 133 найменування.

Вступ містить достатню аргументацію актуальності роботи, постановку мети та відповідних завдань дослідження, обґрунтування наукової новизни дослідження та практичної цінності отриманих результатів, що виносяться на захист. У вступі також зазначено особистий внесок здобувача.

Огляд літератури складається з трьох частин. В першій частині автором висвітлено різноманіття низькопорогових кальцієвих каналів. Особливу увагу присвячено молекулярній структурі Т-каналів, їхнім біофізичним властивостям з ухилом на фармакологічні характеристики Т-каналів, регуляції експресії генів Т-каналів та фізіологічній ролі Т-каналів. Друга частина присвячена даним, щодо експресії та функцій низькопорогових кальцієвих каналів у нейронах різних відділів нервової системи - у таламусі у корі великих півкуль. В останній частині представлено дані літератури, щодо молекулярно-генетичних та фізіологічних аспектів які супроводжують чи то є первопричиною дитячої абсансної епілепсії. Представлено тваринні моделі створені для дослідження такого типу патологій і більш детально охарактеризовано модель абсансної епілепсії у щурів лінії WAG/Rij, яка і була використана в представлених дослідженнях.

Матеріал, викладений в огляді літератури, свідчить про високу наукову ерудицію дисертанта та здатність до критичного аналізу і узагальнення фактичного матеріалу.

При виконанні роботи дисертантом застосовано широкий спектр методів сучасної фізіології та молекулярної біології, що детально описані у розділі “Матеріали і методи досліджень”. Цей розділ демонструє відмінне володіння автором сучасними методичними підходами.

Розділ “Результати власних досліджень” складається з п’яти підрозділів. Перший підрозділ присвячено модифікації методу полімеразної ланцюгової реакції для оцінки експресії генів у окремих нейронах. Абсолютно зрозумілу, що цей метод потребував адаптації до конкретних умов експерименту, адже аналізували експресію генів в поодиноких клітинах які були вже попередньо об’єктами електрофізіологічних вимірювань за специфічних експериментальних умов. Відповідно, щоб уникнути артефактів спричинених попередніми експериментами дисертантом було підібрано умови проведення ПЛР, що потребувало ретельних перевірок та аналізу даних експериментів.

В другому підрозділі представлено дані, щодо експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі щурів. Перш за все було проведено аналіз нейрон-специфічної експресії генів  $\alpha 1$ -субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі. Однак дані ПЛР для однієї клітини не дозволили зробити однозначних висновків щодо нейрон-специфічної експресії генів кальцієвих каналів Т-типу в різних групах нейронів таламусу і відповідно подальші дослідження було проведено на цілих ядрах, зокрема латеродорзальному (ЛД) та сітчастому (СЯ).

З огляду на те, що швидкий та повільний компонент струму змінюються у онтогенезі було більш детально проаналізовано онтогенетичний аспект експресії мРНК альфа1-субодиниць низькопорогових кальцієвих каналів в таламусі з використанням щурів різного постнатального віку. Виявлено важливі закономірності, а саме динаміку до загального зменшення експресії

мРНК різних ізоформ з віком, що суттєво відрізнялась для різних форм. Цікаво, що дані кількісного аналізу експресії відповідних ізоформ каналів Т-типу не узгоджуються з електрофізіологічними характеристиками нейронів щурів цього віку, що свідчить на користь існування регуляції активності ізоформ на рівні білка, або ж регуляції трансляції.

В третьому підрозділі представлено дані аналізу особливостей функціонування низькопорогових кальцієвих каналів у мозку щурів лінії WAG/Rij, що є моделлю абсансної епілепсії.

Аналіз експресії каналів Т-типу у сітчастому ядрі дорослих щурів лінії WAG/Rij та контрольних щурів Wistar показав відсутність статистично значущих відмінностей між двома лініями. Натомість у «кортикальному фокусі», де за вимірами ЕЕГ розпочинаються абсанси в щурів WAG/Rij рівень експресії мРНК  $Ca_v3.1$  у дорослих щурів був у 2,5 рази вищим у модельних тварин порівняно з контрольними. Автор також зазначає, що статистично значиме підвищення рівня експресії мРНК  $Ca_v3.1$  (в 1,8 рази) на користь лінії WAG/Rij спостерігалось і у 10-денних, однак згідно даних наведених на Рис.3.10 різниця відсутня. Можливо автор мав на увазі експресію експресії мРНК  $Ca_v3.2$ , де дійсно спостерігається підвищення.

Цікавою виявилася і динаміка експресії мРНК всіх ізоформ -  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$ ,  $Ca_v3.3$  залежно від віку щурів, що була подібною у модельних і контрольних тварин, однак зі статистично достовірними змінами . рівня експресії для  $Ca_v3.1$  та  $Ca_v3.2$  у різних вікових груп.

Приймаючи до уваги суперечливі дані літератури щодо Т-струмів в кортикальних нейронах, дисертантом методом "петч-клемп" було проаналізовано окремі нейрони 10-денних щурів при цьому струмів не було зареєстровано, однак на рівні білка присутність в тканинах  $Ca_v3.1$  було підтверджено. При цьому вміст

Ca<sub>v</sub>3.1 був вдвічі більшим у модельних щурів WAG/Rij, хоча на рівні мРНК це не було показано раніше! Таким чином, зміни експресії ізоформи Ca<sub>v</sub>3.1 дійсно свідчать на користь залучення цього каналу до проявів абсанс-епілептичного фенотипу щурів лінії WAG/Rij, однак відсутність Т-струмів у гостроізолюваних кортикальних нейронах не дозволяє зробити щодо цього однозначний висновок.

Для розширення розуміння ролі змін експресії Т-каналів у моделі абсанс-епілепсії надалі було порівняно експресію каналів Т-типу в латеродорзальному ядрі ліній WAG/Rij та Wistar методом кількісної ПЛР. Згідно отриманих даних було виявлено статистично значущі відмінності в рівні експресії Ca<sub>v</sub>3.1 та Ca<sub>v</sub>3.2, які супроводжувалися і відмінностями в кальцієвих струмах в ізолюваних нейронах латеродорзального ядра різних груп щурів. Характер змін дещо відрізнявся від даних літератури, однак дисертант надає декілька обґрунтованих пояснень.

Підсумовуючи отримані дані дисертантом зроблено узагальнення про існування специфічних змін в експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів не лише в ході нормального розвитку мозку щурів, а й за умов експериментальної абсансної епілепсії. Не останню роль в регуляції таких змін відіграють мікроРНК. Саме з'ясуванню ролі мікроРНК в регуляції експресії генів низькопорогових кальцієвих каналів було присвячено подальші дослідження.

Біоінформаційним аналізом було виявлено gno-miR-1 як потенційний регулятор експресії Ca<sub>v</sub>3.2 каналу Т-типу. Згідно даних ПЛР аналізу було виявлено оберненопропорційне відношення рівнів gno-miR-1 та мРНК Ca<sub>v</sub>3.2, при чому рівень gno-miR-1 у «кортикальному фокусі» соматосенсорної кори був знижений у 3



рази. Таким чином отримані дані свідчать на користь негативної регуляції експресії мРНК  $Ca_v3.2$  з боку rno-miR-1.

У п'ятому підрозділі дисертантом проведено аналіз та узагальнення власних результатів з урахуванням даних літератури. Важливо, що зроблено акцент на дані, що є суперечливими згідно даних інших авторів чи навіть відрізняються від очікуваних. Заме з'ясування таких ключових моментів є надзвичайно важливим для формування повного уявлення про роль Т-каналів і в тому числі за абсансної епілепсії.

В цілому ж висновки і основні положення дисертаційної роботи Болдирева Олексія Ігоровича відповідають меті та поставленим завданням дослідження, повністю базуються на власних результатах досліджень. Результати експериментів статистично оброблені, а їх достовірність не викликає сумніву. Автореферат дисертації повністю відображає зміст дисертаційної роботи.

Результати дисертаційної роботи Болдирева Олексія Ігоровича у повному об'ємі опубліковані в провідних фахових виданнях, рекомендованих для захисту кандидатських дисертацій та пройшли всебічну апробацію на вітчизняних та міжнародних форумах. В цілому по темі дисертації опубліковано 5 статей, 16 тез доповідей на конференціях.

До роботи є деякі зауваження.

1. Не зовсім коректно сформульовані деякі положення мети дослідження серед яких: “виявити зміни експресії низькопорогових кальцієвих каналів у таламусі.....”; “провести кореляцію між профілями експресії каналів, функціональними характеристиками нейронів і вираженістю епілептичного фенотипу”. За мету не можна ставити бажаний кінцевий результат (саме зміни експресії). Метою може бути аналіз експресії генів (де зміни можуть бути і відсутніми) та аналіз можливої кореляції між експресією генів певних іонних каналів та функціональними характеристиками нейронів (кореляція так само може бути відсутньою).

2. Чому не порівнювали рівень експресії мікроРНК специфічної до  $Ca_v3.2$  у «кортикальному» фокусі у 25-денних щурів (модельних та контрольних)? Адже саме на цей день було виявлено статистично достовірні відмінності в експресії мРНК  $Ca_v3.2$  в модельних та контрольних тварин в даній зоні. Адже цікаво чи пов'язане суттєве зменшення рівня експресії мРНК  $Ca_v3.2$  у модельних щурів порівняно з контрольними, саме підвищенням експресії мікроРНК у модельних тварин.

Однак висловлені зауваження ніяким чином не впливають на загальне позитивне враження від представленої роботи.

Вважаю, що дисертація Болдирєва Олексія Ігоровича за своєю актуальністю, об'ємом, науково-практичною значимістю, новизною отриманих результатів та всебічним аналізом відповідає вимогам п.п. 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013, № 567, а її автор Болдирєв Олексій Ігорович заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

Завідувач відділу сигнальних систем клітини

Інституту молекулярної біології і генетики

НАН України, доктор біологічних наук,

Професор

Ідентифікаційний код 05417101



В.В.Філоненко.

Підпис проф. Філоненко В.В.  
посвідчується  
Зав. відд. Із Мейсєва