

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Луцько Олесі Володимирівни

“МОДУЛЯЦІЯ КАТІОННИХ КАНАЛІВ ВЕЛИКОЇ ПРОВІДНОСТІ ВНУТРІШНЬОЇ МЕМБРАНИ НЕЙРОНІВ ПУРКІНЬС МОЗОЧКА ЩУРІВ”

представлену на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність проведених досліджень

Дисертаційна робота присвячена дослідженню модуляції Катіонних каналів великої провідності (LCC-каналів), які локалізовані на внутрішній мембрані ядра. Іонні канали видаються визначними гравцями для функціонування клітин, та діють на електричну динаміку нейронів, по різному змінюючи свою конформацію. Тому надзвичайно важливо зосередитися на фізіологічній ролі каналів, їх структурі та амінокислотній послідовності. Таким чином, важливо вивчити кінетику поодиноких LCC каналів за допомогою нових блокаторів, що, безсумнівно, є актуальним завданням.

Відомо, що саме аналіз поодиноких іонних каналів надає найбільше інформації про їх конформаційні стани. Використовуючи досить нетривіальний підхід – аналіз бета-розподілу, автор визначає кількість та тривалість конформаційних станів, в яких найчастіше перебувають LCC-канали. Вибраний аналітичний метод дозволяє визначити, що тривалість деяких станів складає всього декілька мікросекунд. Запропонована кінетична модель була використана для визначення механізму дії фармакологічних засобів та відкриває широкі перспективи для подальших досліджень структури та функцій LCC-каналів.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

У дисертаційному дослідженні автором представлено низку фундаментально важливих результатів. Вперше детально описано кінетику LCC-каналів та створено відповідну кінетичну модель. Виявлено перший блокатор для LCC-каналів – тубокурарин. Знайдено інші блокатори серед іонів металів, а саме виявлено та охарактеризовано вплив іонів гадолінію на активність LCC-каналів. Крім цього, виявлено вплив недеполяризуючого агенту галламіну та визначено механізм дії цієї сполуки.

Отримані результати підбору кінетичної моделі можуть бути використані для дослідження механізмів молекулярної взаємодії модулаторів різної хімічної природи з LCC-каналами. Опис механізму дії галламіну за допомогою кінетичної моделі із п'яти станів дозволяє зробити припущення про деякі особливості структури LCC-каналів.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Достовірність наукових положень, які виносяться на захист, базується на великому масиві одержаних експериментальних даних з використанням методу реєстрації струмів поодиноких іонних каналів – петч-клемп в конфігурації inside-out, що цілком відповідає поставленій меті і завданням роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано у відповідності до науково-дослідної тематики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України “Клітинні та молекулярні механізми функціонування нейронів головного мозку в нормі та патології”.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам

Дисертаційна робота Лунько О. В. побудована за загальноприйнятою формою у відповідності до вимог МОН України та складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, викладення результатів власних досліджень, обговорення результатів, а також висновків. Список використаних джерел містить 305 посилань. Робота викладена на 155 сторінках друкованого тексту, містить 5 таблиць та проілюстрована 47 рисунками, які дають повне уявлення про об'єм та якість проведених досліджень.

У вступі аргументується значення іонних каналів ядерної оболонки для функціонування ядра. Автор описує сучасний стан досліджень та підкреслює важливість інформації про кінетику іонних каналів та їх фармакологічний профіль для поглиблення знань про процеси, які відбуваються в ядрі живих клітин.

Розділі 1 (Огляд літератури) складається з двох основних частин, в яких висвітлюються загальні відомості стосовно обраної тематики. Перша частина стосується опису структури ядерної оболонки та транспортних систем, які входять до її складу, а в другій частині автор розглядає типи модуляції та детально описує різноманітні механізми блокування іонних каналів. Всі розглянуті питання повністю узгоджуються з основними напрямками досліджень, які проведені в даній роботі.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) описана процедура виділення ядер нейронів Пуркінє, в яких внутрішня мембрана доступна для петч-клемп досліджень. Детально описано аналіз даних з покроковою інструкцією аналізу бета розподілу та відповідними ілюстраціями.

Розділ 3 (Результати досліджень) умовно можна поділити на три частини. В першій частині викладені результати пошуку речовин, які здатні потентно блокувати трансмембранні струми LCC каналів. Було перевірено цілісні отрути, токсини та анестетики, а також іони металів. В результаті проведеної роботи вдалося знайти перший блокатор для LCC каналів – тубокурарин. Вплив цієї

сполуки характеризувався швидким блокуванням (flicker-блок) LCC каналів, що призводило до зменшення амплітуди струму, яке було залежним від прикладеного потенціалу на мембрані. Також було виявлено модулюючий вплив трьохвалентних іонів гадолінію. Інший виявлений блокатор, галламін, мав яскраво виражений ефект flicker-блоку, який проявлявся в більшій мірі порівняно з тубокурарином. Такий вплив призводить до значних труднощів для адекватної оцінки фармако-кінетичних параметрів блокування, тому необхідна наявність адекватної кінетичної моделі для LCC каналів.

В другій частині роботи за допомогою аналізу β -розподілу було охарактеризовано швидкі події в реєстрації струмів LCC каналів за контрольних умов для побудови відповідної моделі Маркова. Також було досліджено стаціонарні та нестаціонарні характеристики LCC каналів, зроблено оцінку кінетичних параметрів повільних подій для повного опису переходів між основними конформаційними станами в яких перебувають LCC канали. Було встановлено, що канал перебуває в одному відкритому стані, який зв'язаний з трьома закритими станами, які мають різні константи часу перебування, та одним підрівнем. Показано, що провідність LCC каналів стабільна в діапазоні мембранного потенціалу від -80 мВ до +80 мВ. Константи швидкості переходів для закритих станів від та до основного відкритого стану проявляють чітку залежність від потенціалу.

В третій, заключній, частині цієї роботи на прикладі швидкого блокатора LCC каналів – галламіна, було продемонстровано ефективність використання встановленої моделі Маркова та методу аналізу β -розподілу у дослідженні механізму блокування. Швидке блокування характеризувалося зміною константи швидкості асоціації блокатора, яка залежала від концентрації галламіну. Було встановлено параметри чутливості блокатора до прикладеного мембранного потенціалу. Вибраний метод аналізу кінетики LCC каналів вказує, що галламін діє як класичний поровий блокатор.

Таким чином, було показано, що модель Маркова для LCC каналів та аналіз β -розподілу є потужними аналітичними інструментами для встановлення

механізму та обчислення кінетичних характеристик модуляції струмів через поодинокі LCC канали.

В розділі 4 обговорюються результати проведених досліджень у порівнянні з попередніми дослідженнями цієї проблематики, робляться підсумки.

Висновки роботи загалом відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані у 16 статтях та тезах конференцій та доповідались на фахових наукових конференціях..

Під час рецензування дисертаційної роботи виникли наступні **запитання та зауваження**:

1. Час релаксації при переходах між потенціалами в різних напрямках неоднаковий. Чи є у вас припущення з чим це може бути пов'язано і чому так відбувається? Чи є подібні приклади серед інших іонних каналів?
2. Для підбору моделі Маркова ви аналізуєте лише ті події, які найчастіше зустрічаються в реєстраціях поодиноких LCC-каналів. Чи можливо включити до аналізу події, які зустрічаються не так часто?
3. Кальцій та іони лантаноїдів такі як гадоліній мають дуже близький радіуси. Чому на Вашу думку вони мають різні ефекти на LCC-канали?
4. Яку ширину інтервалів частоти Ви використовували для аналізу даних? Як ширина інтервалів впливає на амплітудну гістограму?
5. Чи проводили Ви валідацію методу аналізу бета-розподілу? Як Ви можете довести, що константи переходів обчислені правильно?

Висновок:

Даний рукопис є структурованою та самостійно написаною дисертацією з внеском автора, який можна ідентифікувати. Результати гарно представлені, а

їх інтерпретація на доволі високому науковому рівні. Релевантність, наукова новизна, високим методологічний рівень, теоретичний та практичний внесок, висновки, перспективи наукового та практичного використання представленої дисертації задовольняють загальним вимогам для цього типу академічних робіт згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами).

З вище названих причин я рекомендую прийняття кандидатської роботи під назвою «Модуляція катіонних каналів великої провідності внутрішньої мембрани нейронів Пуркінє мозочка щурів» та присудження Олесі Лунько наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Офіційний опонент

старший науковий співробітник відділу клінічної та експериментальної епілепсії

Інституту нейрології Університетського коледжу Лондона

д. б. н. Савченко Л. П.