

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу Малєєвої Галини Василівни "Модуляція функції та експресії гліцинових рецепторів у різних клітинних системах" подану на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

**Актуальність обраної теми.** Дисертація Малєєвої Галини Василівни "Модуляція функції та експресії гліцинових рецепторів у різних клітинних системах" є оригінальним дослідженням гліцинових рецепторів на поверхні пірамідних нейронів та астроцитів СА1 зони гіпокампа в контролі та за умов киснево-глюкозної депривації, впливу гінкголевої кислоти, компоненту екстракту *Ginkgo biloba*, та ніфлумової кислоти, блокатора потенціалкерованих  $Cl^-$  каналів, на функціонування гліцинових рецепторів різної субодиничної композиції.

Складні механізми регуляції синаптичної передачі забезпечують злагоджену відповідь окремих клітин та органів на сигналізацію про зміни зовнішніх умов, підтримують стаціонарне протікання метаболічних процесів та контролюють функції вищої нервової діяльності. Вагомий внесок в регуляцію синаптичної передачі роблять гальмівні лігандкеровані цис-петельні рецептори, що формують як аніон-, так і катіон-селективні канали. Відомо, що катіон-селективні представлені серотоніновими та нікотиновими апетитохоліновими рецепторами, у свою чергу, аніон-селективні – рецепторами  $\gamma$ -аміномасляної кислоти (ГАМК) та гліцину.

Гліцинові рецептори є ключовою ланкою гальмівної нейротрансмісії у ЦНС. Гліцинові рецептори мають достатньо тривалу історію вивчення структури і функцій. Однак, останнім часом отримані результати, які вказують на залучення гліцинових рецепторів до контролю широкого кола фізіологічних процесів, зокрема моторно-рухової діяльності, дихання, відчуття болю, сприйняття звукових та візуальних сигналів.

Порушення функціонування гліцинових рецепторів може бути причиною розвитку патогенезу, зокрема, гіперплексії, болю запального типу та епілепсії. Беручи до уваги поширене розповсюдження гліцинових рецепторів у ЦНС, їх можна розглядати як перспективну молекулярну мішень для попередження розвитку патологій та лікування дисфункцій ЦНС.

Безумовно, вивчення гліцинових рецепторів є актуальним з огляду можливостей регуляції їх активності та експресії. Актуальність вивчення гліцинових рецепторів обумовлена, також, недавніми результатами про можливий нейропротекторний ефект модуляції активності гліцинових рецепторів.

Затишається малодослідженою роль гліцинових рецепторів у процесах відновлення ушкоджень клітин нервової тканини, і відповідно, функцій ЦНС. Відомо, що гіпокамп є важливим центром комунікації в мозку і відповідає за такі важливі функції, як навчання та пам'ять. Надзвичайно актуальним є питання вивчення молекулярних механізмів, що забезпечують функції вищої нервової діяльності, а також, засоби відновлення функцій ЦНС за умов ішемії, що є поширеною причиною втрати таких функцій.

Пошук і тестування природних модуляторів гліцинових рецепторів також є вагомим питанням сучасного світу, що окремо підкреслює актуальність роботи. Вивчення механізмів взаємодії гліцинових рецепторів із фармакологічно активними речовинами дозволить краще зрозуміти особливості структури цих рецепторів та принципи регуляції їх активності.

Перевагою представленої роботи є використання декількох експериментальних клітинних систем. Зокрема, дослідження змін щільності гліцинових рецепторів за умов киснево-глюкозної депривації проведено із застосуванням органотипової культури зрізів гіпокампа. Необхідно зазначити, що даний метод забезпечує збереження структури, що притаманна гіпокампу в нормі, та синаптичних контактів між нейронами, що є принципово важливим для вивчення властивостей рецепторів у нативних умовах.

Враховуючи представлений експериментальний і теоретичний матеріал, дисертаційна робота пропонує нову концепцію структурно-функціональних змін в центральній нервовій системі за умов впливу несприятливих чинників, дія яких індукує розвиток окисного стресу у нервовій тканині. Перспективним для модуляції активності гліцинових рецепторів є вивчення

можливостей використання гінкголевої кислоти, що є компонентом екстракту *Ginkgo biloba*, вибірково потенціювати струми, що опосередковані цими рецепторами.

**Зв'язок роботи з науковими програмами і темами.** Вагомість дисертаційної роботи обумовлена тим фактом, що вона виконана в рамках науково-дослідних робіт відділу цитології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011-2013 рр., номер державної реєстрації 0110U004750) та «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2018 рр., номер державної реєстрації 0113U007273); та Інституту Системних Нейронаук, Марсель, Франція (Institut de Neurosciences des Systèmes, Marseille, France): «Функції та модуляція рецептор-керованих каналів».

Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей функціонування гліцинергічної системи гіпокампа за умов киснево-глюкозної депривації; пошуку нових речовин, здатних модулювати роботу гліцинових рецепторів; а також вивченні можливості використання нейронів, генерованих із фібробластів людини, для дослідження гліцинових рецепторів.

Для досягнення мети було поставлені завдання, які повністю відповідають назві та меті роботи.

У дисертаційній роботі застосовані адекватні сучасні методи дослідження процесів регуляції активності рецепторів та іонних потоків, що асоційовані з стимуляцією рецепторів. В ході виконання поставлених завдань у роботі було застосовано низку сучасних методик культивування тваринних клітин, гістохімічні та електрофізіологічні методи. Зокрема, було здійснено культивування органотипових зрізів гіпокампа, лінії клітин СНО; генерацію нейронів із фібробластів людини та їх культивування. Для дослідження гліцинових рецепторів пірамідних нейронів та астроцитів гіпокампа було застосовано імуногістохімічне забарвлення зрізів гіпокампа із використанням специфічних антитіл NeuN, GFAP та GlyR. Аналіз отриманих забарвлених зрізів проводили із застосуванням конфокальної мікроскопії.

**Наукова новизна одержаних результатів.** В дисертаційній роботі вперше було продемонстровано КГД-індуковане зменшення кількості гліцинових рецепторів, експресованих на поверхні пірамідних нейронів гіпокампа. Вперше було показано, що гінкголева кислота є позитивним модулятором гліцинових рецепторів та вперше виявлено амінокислотні залишки, що є відповідальними за субодинично-вибірккову дію гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори. Встановлено, що ніфлумова кислота є блокатором каналу гліцинового рецептора та ідентифіковано амінокислотний залишок, що бере участь у цьому процесі. Вперше виявлено гліцинові рецептори на нейронах, генерованих із фібробластів людини.

Дисертантом показано, що нейрони, генеровані із фібробластів людини за новітнім методом, мають усі характеристики функціональних нервових клітин. Визначено, що дані нейрони експресують на своїй поверхні гліцинові рецептори. Це відкриває можливості для їх використання при дослідженні патології гліцинових рецепторів людини – гіперплексії, обумовлено мутаціями гену, що кодує субодиниці гліцинового рецептора.

**Теоретичне і практичне значення отриманих результатів.** Отримані дані свідчать про важливість дослідження участі гліцинових рецепторів у розвитку пост-ішемічного стану та перспективність їх використання у якості мішені для розробки нейропротективних препаратів. У ході дослідження виявлено два нових модулятори гліцинових рецепторів; особливе значення має позитивний модулятор гінкголева кислота, оскільки він може бути застосований для корекції патологічних станів, що супроводжуються пригніченням роботи гліцинових рецепторів. Значним практичним результатом представленої роботи є розробка нових клітинних систем для вивчення гліцинових рецепторів, зокрема, враховуючи сучасні перспективи вирощування в культурі клітин людини. Окрім того, було показано, що нейрони, генеровані із фібробластів людини, експресують на своїй поверхні гліцинові рецептори, а отже можуть бути використані для дослідження дисфункції гліцинових рецепторів людини.

Отримані в роботі результати мають загальнобіологічне значення, а також розширюють уявлення про участь гліцинових рецепторів в широкому колі нервових і загально біологічних

функцій. Застосування результатів представленого дослідження є перспективним при проведенні фізіологічних і молекулярних досліджень патологічних станів нервової системи.

**Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень.** Основні наукові положення підтверджено достатнім обсягом проведених досліджень і характером отриманих результатів. Викладення матеріалу логічне і повністю відповідає поставленій меті та завданням дослідження. Фактичний матеріал дисертації і висновки, які слідують з цього були апробовані в наукових виданнях, на конференціях та з'їздах.

Узагальнюючі дані дисертації відповідають фактичному матеріалу. Сформульовані наукові положення та висновки до кожного розділу та в цілому по дисертації експериментально обґрунтовані. Викладені найбільш важливі наукові результати, що мають значення для наукових досліджень і практики. Висновки, зроблені в дисертації, повністю відображають зміст обґрунтованих теоретично і експериментально наукових положень та рекомендацій. Використання взаємодоповнюючих сучасних методів сприяло отриманню достовірних даних, більшість з яких є новими.

Застосовані в роботі для статистичного аналізу математичні підходи варіаційної статистики також свідчать на користь достовірності наведених у дисертації результатів експериментальних досліджень.

**Повнота викладення у наукових працях.** Основні положення дисертації представлені та обговорені на X Anniversary Ukrainian - Polish - Belorussian Conference "Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications" (Kyiv, Ukraine, 2013); VI Конгрес Українського Товариства Нейронаук (Київ, Україна, 2014); 9th FENS Forum of Neuroscience (Milano, Italy, 2014); European Society for Neurochemistry's Conference "Molecular Mechanisms of Regulation in the Nervous System", Young Members Symposia (Tartu, Estonia, 2015); Biennial meeting of International Society for Neurochemistry (Cairns, Australia, 2015); Conference of Young Scientists-2015 (Kyiv, Ukraine, 2015); 3-тя Міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, Україна, 2015); 10th FENS Forum of Neuroscience (Copenhagen, Denmark, 2016).

Матеріали дисертації викладені у 15 публікаціях: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, та 8 тез доповідей на наукових конференціях.

Основний зміст роботи, що включає матеріали та методи дослідження, результати досліджень та їх обговорення викладений достатньо повно, в логічній послідовності і зрозумілий. Все це разом і висновки, які зроблені на підставі отриманих результатів дають уяву про те, що автор виконав достатньо великий обсяг логічно та послідовно запланованих експериментів. Висновки повністю відповідають меті і завданням дослідження. У сукупності результати дисертації є суттєвими для розвитку фізіології, нейрохімії, нейробіології, і біохімії нервової системи.

**Питання та зауваження до дисертаційної роботи.** Після ознайомлення з дисертаційною роботою виникли наступні запитання та зауваження:

1. У результатах впливу КГД зазначено, що «астроцити були значно менш чутливими до впливу КГД». З якими особливостями астроцитів пов'язана така відмінність відносно нейронів?

2. Передбачається, що «процес інтерналізації гліцинових рецепторів пов'язаний із порушеннями іонного та енергетичного метаболізму». Однак наведена динаміка змін флуоресцентного забарвлення рецепторів на пірамідальних нейронах і активності мітохондрій суттєво відрізняються. Яким чином можна пояснити передбачений зв'язок?

3. Чим обумовлена потенціал-залежність взаємодії ніфлумової кислоти із гліциновими рецепторами?

Можливо, у висновках було б доцільно вказати певні показники визначених результатів.



Наведені питання і зауваження ні в якій мірі не знижують значення і вагомості представленого дослідження.

Виходячи з вищевикладеного, вважаю, що за об'ємом опрацьованого матеріалу, актуальністю, новизною, теоретичним і практичним значенням, достовірністю результатів і обґрунтованістю висновків дисертаційна робота Малєєвої Галини Василівни "Модуляція функції та експресії гліцинових рецепторів у різних клітинних системах" відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» затвердженого постановою Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013, а автор заслуговує присудження вченого ступеня кандидата біологічних наук з спеціальності 03.00.13 – "фізіологія людини і тварин".

Офіційний опонент

професор кафедри біофізики та біохімії

Дніпропетровського національного університету

імені Олеся Гончара,

доктор біологічних наук

В.С. Недзвецький

