

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА
про науково-практичну цінність дисертаційної роботи
Думанської Ганни Валентинівни
"Синаптична передача між гангліозними клітинами сітківки та
нейронами *colliculus superior* в кокультурі в нормі та при
гіпоксії",
представлену на здобуття наукового ступеню
кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Актуальність теми дослідження. Дисертаційна робота Думанської Г. В. присвячена з'ясуванню нейромедіаторної природи синаптичної передачі від аферентних проєкцій сітківки в субкортикальний зоровий центр з використанням досліджень окремих пар кокультивованих гангліозних клітин сітківки (ГКС) та нейронів *colliculus superior* (CS) в нормі та при дефіциті кисню. Визначення фізіологічних властивостей нейропередачі в даних первинних аферентних синапсах зорової системи є важливим і актуальним з огляду на її ключову роль у передачі зорової інформації.

Для дослідження вказаних властивостей автор використовує *in vitro* модель – кокультуру дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS щурів. За умов кокультури нейрони різних популяцій зберігали свої функціональні властивості та відтворювали синаптичні зв'язки, які загалом зберігають властивості передачі зорової інформації від сітківки до ЦНС. Використання сучасних електрофізіологічних методів на такому об'єкті надає можливість реєструвати трансмембранні струми та потенціали у парах окремих, добре ідентифікованих пре- та постсинаптичних нейронів, що є значним методичним кроком у дослідженні нейропередачі між гангліозними клітинами сітківки та нейронами CS.

Цікавим етапом роботи є розкриття механізмів індукованих гіпоксією пластичності збуджувальної та гальмівної нейропередачі в даних синапсах, зокрема довготривалої потенціації НМДА рецептор-опосередкованої глутаматергічної передачі та довготривалого пригнічення ГАМК_A рецептор-опосередкованої нейропередачі. Дані феномени очевидно мають важливе значення у контексті патофізіологічних змін, що виникають під час гіпоксичних ушкоджень зорової системи. Основна увага у роботі приділена дослідженню ролі пре- та постсинаптичних зон первинних синапсів у виникненні такої патологічної пластичності нейропередачі.

Результати дисертаційної роботи демонструють, що на рівні окремих синаптичних контактів пар ГКС – нейрон CS відбувається істотна опосередкована гіпоксією модуляція ефективності нейропередачі. Так показано, що гіпоксія індукована довготривала потенціація НМДА рецептор-опосередкованої передачі реалізується за рахунок усунення магній-залежного блоку даних рецепторів та збільшення загальної кількості сайтів вивільнення в активних синапсах. Індукована гіпоксією довготривала депресія ГАМК-ергічної передачі в даних синапсах пов'язана як зі зменшенням кількості активних місць вивільнення, так і зі зменшенням чутливості постсинаптичної мембрани до трансмітера. Наявні різноспрямовані довготривалі ефекти збуджувальної та гальмівної передачі можуть розглядатися як незалежні паралельні патологічні механізми ушкоджуючої дії гіпоксії на дану ланку зорової системи.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в комплексному дослідженні синаптичної передачі від поодинокі ГКС до окремого ідентифікованого нейрону CS в умовах кокультури в нормі та при гіпоксії. Вперше встановлено феномен індукованої гіпоксією

довготривалі пластичності збуджувальної та гальмівної нейропередачі на окремих парах нейронів та описана роль пре- та постсинаптичних механізмів в їх реалізації.

Теоретичне та практичне значення результатів дослідження.

Найбільш важливими складовими частинами дисертаційного дослідження є наступні:

- встановлення природи основних нейромедіаторів, що опосередковують передачу в досліджуваних синапсах;
- детальна характеристика біофізичних аспектів (зокрема квантової природи) вивільнення нейромедіаторів;
- дослідження властивостей короткотривалої пластичності як збуджувальної, так і гальмівної передачі за нормальних умов;
- з'ясування характеру та механізмів змін ефективності синаптичної передачі при гіпоксії.

Отримані в кожній з цих частин результати гармонійно і у логічній послідовності розвивають наші уявлення щодо природи нейропередачі між гангліозними клітинами сітківки та нейронами CS. У своїй сукупності вони мають фундаментальне та прикладне значення, оскільки вони істотно поглиблюють сучасні уявлення про функціонування окремих первинних синаптичних контактів зорової системи в нормі та при гіпоксії. Дисертанткою вперше досліджено індуковану дефіцитом кисню пластичність та встановлено ключові механізми, що опосередковують зміну ефективності нейропередачі за цих патологічних умов. Таким чином, результати дослідження можуть бути корисними в розробці нових або вдосконаленні існуючих методів корекції викликаних гіпоксією порушень зору.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи. Наукові положення, наведені в дисертації, базуються на використанні комплексу сучасних

електрофізіологічних методів, достатній кількості експериментів, адекватному виборі експериментальної моделі гіпоксії *in vitro*, статистичному аналізі результатів та, їхньому обговоренні в контексті літературних даних в даній галузі досліджень. Думанська Г.В. показала себе досвідченим, компетентним експериментатором і аналітиком, вона добре обізнана з науковою літературою по досліджуваній проблематиці, здатна до критичного аналізу власних результатів.

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

Роботу виконано у відділі фізіології нейронних мереж Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках наукових проектів «Клітинні механізми реалізації функціональних особливостей нейронів центральної та периферичної нервових систем ссавців» (державний реєстраційний номер № 0113U007274) і «Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів за нормальних та патологічних умов» (державний реєстраційний номер № 0112U001476).

Структура і обсяг дисертації. Дисертаційна робота Думанської Г.В. представлена за загальноприйнятою формою у повній відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 130 сторінках, що включає в себе вступ, огляд літературних даних, матеріалів і методів досліджень, опис результатів власних досліджень, обговорення і узагальнення результатів досліджень, висновки та список цитованої літератури (257 найменувань). Отримані результати ілюстровані 33 рисунками, які дають повне уявлення про значну кількість і високу якість експериментів.

У вступній частині роботи сформульована проблематика дослідження нейропередачі в первинних синапсах аферентних проекцій ГКС в CS в нормі та при гіпоксії, обґрунтована актуальність і важливість дослідження, сформульовані мета та завдання

дослідження, підкреслено новизну роботи та представлені відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації результатів і публікацій за результатами дослідження.

В розділі 1 (Огляд літературних даних) автор висвітлює сучасний стан досліджуваної проблематики. Цей розділ складається з трьох основних підрозділів. В першому розглянуто будову і функцію сітківки, наведена класифікація та зазначена фізіологічна роль ГКС в механізмах обробки та передачі зорової інформації, розглянуто структуру зорових нервів та зорових шляхів, структуру та зорову функцію CS, описано ретінотопічну організацію проекцій ГКС в CS. В другому підрозділі висвітлені відомості про специфіку нейропередачі в синапсах первинних проекцій сітківки в субкортикальний зоровий центр, описані основні відомості щодо субпопуляції іонотропних рецепторів для глутамату та ГАМК, їхню будову та функцію у формуванні ретінотопічних проекцій. В третьому підрозділі описані типи гіпоксії, проаналізовані дані про участь гіпоксії в багатьох дегенеративних захворюваннях зорової системи, а також при гіпоксичних ураженнях сітківки та ГКС.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) обґрунтовано вибір напрямку та об'єкту дослідження – кокультури дисоційованих клітин сітківки та нейронів CS – як адекватної моделі для досягнення цілей та вирішення задач дослідження. Детально описана методика приготування кокультури нейронів, електрофізіологічні, біохімічні та статистичні методи, протоколи парної стимуляції та модель гіпоксії *in vitro*. Варто особливо відзначити технічну складність використання кокультури нейронів і метода подвійної петч-клемп реєстрації, що і дозволило автору отримати нові і важливі результати.

В розділі 3 (Результати досліджень) представлено морфологічні та електрофізіологічні характеристики кокультивованих ГКС та нейронів CS, проведено детальний аналіз кінетичних та фармакологічних властивостей постсинаптичних струмів в досліджуваних синапсах, що дозволило виявити основні типи хімічної передачі та встановити роль субпопуляцій постсинаптичних рецепторів у реалізації синаптичної дії.

Була визначена квантова природа та описаний ймовірнісний характер вивільнення глутамату та ГАМК в первинних аферентних зорових синапсах. Описані характер та механізми короткочасної пластичності глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичної передачі при парній стимуляції. Крім того, досліджувалися опосередковані гіпоксією зміни ефективності збуджувальної та гальмівної нейропередачі на окремих парах ГКС – нейрон CS, зокрема довготривалу потенціацію НМДА-рецепторопосередкованої передачі та довготривалу депресію ГАМК_A рецептор-опосередкованої передачі.

В заключному розділі (Обговорення результатів) результати досліджень обговорюються в широкому контексті відомостей про механізми синаптичної передачі та можливості її модуляції. Даний розділ в повній мірі відображає суть проведених досліджень та отриманих результатів.

Розділ (Висновки) складається з п'ятих положень, які підсумовують отримані результати досліджень. Висновки чіткі, відповідають поставленим завданням, повністю базуються на отриманих результатах.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих працях та авторефераті. Матеріали дисертації опубліковані у 5 статтях у наукових фахових журналах, 9 тезах доповідей у матеріалах

вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів. Отримано один патент України на корисну модель. Опубліковані праці свідчать про повноту викладу наукових положень та висновків, сформульованих у дисертації. Автореферат дисертаційної роботи відповідає основним її положенням, добре ілюструє основні результати та розкриває суть дослідження.

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

1. Яким чином визначала величину синаптичної затримки (с. 56) та чи відрізнялася вона для АМПА- і НМДА рецептор-опосередкованих відповідей?
2. ГКС та нейрони CS ідентифікували за морфологічними та електрофізіологічними особливостями, але на основі проєкцій і функцій розрізняють принаймні 5 основних класів ГКС. Чи спостерігали різні типи цих клітин, які описані в Огляді літератури в підрозділі 1.1.2?
3. Серед глутаматних рецепторів крім АМПА і НМДА рецепторів є також підтип каїнатних рецепторів, а до іонотропних ГАМК рецепторів крім ГАМК_A відноситься також ГАМК_C підтип. Останній був вперше ідентифікований саме в сітківці ока, і щодо його існування тривають дискусії. Ці рецептори практично не згадуються у роботі, але чи є підстави (експериментальні або за даними літератури) виключити роль цих рецепторів у нейропередачі між гангліозними клітинами сітківки та нейронами CS?

В цілому високо оцінюючи дисертаційну роботу Думанської Г.В., все ж варто зробити деякі **зауваження** та висловити **побажання** щодо подальшого розвитку цих досліджень:

1. В огляді літератури (с. 29-30) розглядається питання кінетики інактивації НМДА- та АМПА рецептор-опосередкованих постсинаптичних струмів. Для ліганд-керованих каналів краще вживати термін «десенситизація», а не інактивація, яка характерна для потенціал-керованих іонних каналів.
2. Утворення активних форм кисню і азоту при моделюванні гіпоксії *in vitro*, порушення нейропередачі в процесі реоксигінації (як правило, це спричиняє більш інтенсивне ушкодження клітин, ніж власне гіпоксія), патофізіологія діабетичної ретинопатії – всім цим питанням варто було б приділити більше уваги якщо не в експериментах, то принаймні при обговоренні результатів.
3. В роботі показана істотна різниця в тривалості індукованих гіпоксією потенціації НМДА рецептор-опосередкованої передачі та депресії ГАМК-ергічної нейропередачі у порівнянні з пригніченням АМПА-рецептор опосередкованої синаптичної передачі у контексті реоксигінації. У висновках 3-5 варто було б це підкреслити, адже ці результати мають вагоме практичне значення.
4. Робота написано грамотно, але на жаль у ній інколи трапляються дещо невдалі або неточні вирази, наприклад, с.36 «гладку поверхню» (потрібно гладеньку); с. 37 «Після ферментації тканини» (потрібно ферментативної обробки); с. 38 «Кокультуру інкубували в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю (5 % CO₂)» - така концентрація CO₂ є фізіологічною нормою, тому навряд чи слід вважати її підвищеною.

Слід підкреслити, що висловлені зауваження і побажання до подальших досліджень суттєво не впливають на загалом високу оцінку даної дисертаційної роботи.

Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, високим методичним рівнем, теоретичною та практичною значністю, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, а також перспективами наукового і практичного застосування дисертаційна робота Думанської Ганни Валентинівни *"Синаптична передача між гангліозними клітинами сітківки та нейронами colliculus superior в кокультурі в нормі та при гіпоксії"*, відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

Офіційний опонент

професор і в.о. завідувача кафедри біофізики

ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.

ПІАПИС ЗАСВІДЧУЮ
ВЧЕНИЙ СЕКРЕТАР ННЦ
КАРАУЛЬНА І.В.
05.06.2017

