Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0425U000033

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 11-02-2025

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Дромарецький Андрій Валентинович
2. Andriy V. Dromaretsкkyy

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: кандидат наук

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 03.00.02

Назва наукової спеціальності: Біофізика

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 11-03-2025

Спеціальність за освітою: Електронні прилади та пристрої

Місце роботи здобувача: Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417093

Місцезнаходження: вул. Богомольця, буд. 4, Київ, 01024, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 26.198.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417093

Місцезнаходження: вул. Богомольця, буд. 4, Київ, 01024, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417093

Місцезнаходження: вул. Богомольця, буд. 4, Київ, 01024, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації: Українська

Коди тематичних рубрик: 34.17.15, 34.17.23

Тема дисертації:

1. Порушення Ca2+-залежної сигналізації гіпокальцину як механізм первинної аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії

2. Perturbed Ca2+ -dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia

Реферат:

1. Кальцієва сигналізація в нейронах є необхідною для регуляції багатьох клітинних функцій. 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. Останні дослідження доводять, що ці білки є вкрай важливими в різних аспектах нейронних дисфункцій і що генетичні мутації білків NCS прямо впливають на розвиток неврологічних захворювань. Таким чином, детальне розуміння фундаментальних аспектів молекулярних і клітинних механізмів регуляції ефекторів за

допомогою нейронних кальцієвих сенсорних білків і їх патологічних змін є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань. Первинна автосомно-рецесивна ізольована дистонія (DYT2) є неврологічним захворюванням, яке проявляється у вигляді неконтрольованих постійних або повторюваних скороченнях м'язів. Такі скорочення можуть призводити до аномальних рухів кінцівок та болісних поз у пацієнта, що негативним чином впливає на якість їх життя. Нещодавні дослідження вказують на зв'язок даного захворювання з мутаціями гена нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцина (HPCA), а саме точковими міссенс-мутаціями N75K та T71N. Цей ген майже виключно експресується у мозку, особливо з високим рівнем експресії у корі, смугастому тілі, мозочку та гіпокампі – саме в тих його ділянках, що змінюються при розвитку дистонії. HPCA має три EF домени, що здатні приєднувати Ca2+. Приєднання Ca2+ до цих доменів призводить до кальцій-залежної конформаційної зміни білка, що супроводжується виходом його N-термінального кінця, котрий містить залишок жирної кислоти мірістоілу, з гідрофобної кишені молекули. Це дозволяє HPCA переміщуватись (транслокуватись) з цитозолю і вбудовуватися за допомогою мірістоілу до внутрішнього шару плазматичної мембрани. Раніше було показано, що саме ця -залежна транслокація HPCA призводить до гальмування коркових та гіпокампальних нейронів завдяки активації струму повільної постгіперполяризації (sAHP). Метою роботи було встановити біофізичні механізми сигналізації гіпокальцина, що контролюють струм повільної гіперполяризації, виявити відмінності в біофізичних властивостях мутантних варіантів T71N та N75K білка гіпокальцина від властивостей білка дикого типу, а також обумовлені цими відмінностями порушення молекулярних сигнальних механізмів, в роботі яких цей білок бере участь. Дослідження проводилось з використанням генетичних, електрофізіологічних та флуоресцентних методів. А для оцінки концентрації експресованих в нейронах різних екзогенних варіантів гіпокальцина було розроблено новітню методику виміру концентрації досліджуваних флуорофорів, що заснована на використанні оптичних спектральних характеристик обладнання та використаних флуоресцентних міток і опорних барвників з відомою концентрацією. В роботі показано, що мутація N75K, виявлена при дистонії типу DYT2, призводить до втрати гіпокальцином його функцій, як сенсора іонів кальцію при фізіологічній нейронній активності. Такий мутований гіпокальцин не може контролювати розвиток повільної постгіперполяризації в нейронах, адже ця мутація змінює можливості гіпокальцина до Ca2+-залежної транслокації із цитозолю до плазматичної мембрани. Транслокація гіпокальцина N75K до плазматичної мембрани апікального дендрита нейрона, який бере участь в генерації струму повільної постгіперполяризації, була помітно та достовірно зменшена порівняно з гіпокальцином дикого типу. Це зменшення супроводжувалось неспроможністю мутантного варіанту гіпокальцина N75K викликати струм повільної постгіперполяризації в додаток до того струму, що був викликаний транслокацією ендогенного гіпокальцина. В той час як експресія гіпокальцина дикого типу призводила до збільшення цього струму. Проте, дана мутація N75K не впливає ні на мірістоіловий перемикач, ні на просторовий розподіл вбудовування білка до плазматичної мембрани. Водночас мутація T71N не призводить до змін у транслокації гіпокальцина. Загалом мутація N75K зумовлює підвищену збудливість нейронів у відповідь на серію пачок потенціалів дії та □-стимуляцію, оскільки даний мутант не викликає гальмівні струми повільної постгіперполяризації. Таким чином, наступні за пачковою активністю нейронів постсинаптичні струми будуть викликати потенціали дії у таких нейронах з більшою імовірністю, що може бути механізмом рухових розладів, які спостерігаються при первинній дистонії типу DYT2.

2. Calcium (Ca2+) signaling plays an essential role in neuronal activity and regulation. Any disruption in this signaling can lead to neurological issues, ranging from minor disorders to severe diseases. The process of interpreting and converting Ca2+ signals into internal neuronal regulation is managed by various systems, including neuronal Ca2+ sensor proteins (NCS), which are key players in this process. The operation of these sensor proteins and their interactions with other systems can be complex, making it challenging to detect dysfunctions, let alone repair them. A deeper understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying this proteins operation is essential to address these challenges and advance our ability to manage neurological disorders. Primary autosomal-recessive dystonia (DYT2) is a neurological movement disorder syndrome that results in sustained or repetitive muscle contractions. Such contractions cause twisting and repetitive movements

or abnormal painful postures, negatively affecting the quality of life. Recent publications demonstrate the connection between this condition and mutations in the gene of neuronal calcium sensor protein hippocalcin (HPCA), namely missense mutations N75K and T71N. The gene is almost exclusively expressed in the brain with high level of expression in the cortex, striatum, cerebellum and hippocampus, i.e. in brain areas revealing abnormalities in dystonia. HPCA contains three EF-hand domains capable of binding Ca2+. The binding results in a Ca2+-myristoyl switch, a Ca2+-dependent conformation change leading to protrusion of its myristoyl-containing N-terminal region out of a hydrophobic pocket of the molecule. This allows HPCA to translocate from the cytosol to the plasma membrane. It is established that this Ca2+-dependent translocation of HPCA leads to inhibition of cortical and hippocampal neurons by gating a slow afterhyperpolarization (sAHP) current. The research aimed to find differences in biophysical properties of mutant variants N75K and T71N of the hippocalcin protein compared with a wild-type variant and resulting alterations in the function of molecular signaling to which this protein contributes. The research was conducted with the use of genetic, electrophysiological, and fluorescent methods. A special technique was developed to estimate the concentration of the expressed variants of hippocalcin with an attached fluorescent tags. The technique is based on the calculations involving optical spectral properties of the equipment and used fluorophores as well as other fluorescent dyes that served as references with known concentrations. This research demonstrates that mutation N75K, which was associated with dystonia DYT2, causes HPCA to lose its functions as a calcium ion sensor under conditions of physiological neural activity. Due to the altered capability of the mutated hippocalcin to perform Ca2+-dependent translocation to the plasma membrane, this variant of hippocalcin is unable to control slow after-hyperpolarization in neurons. Translocation of the N75K hippocalcin mutant to the plasma membrane of neuronal apical dendrites that is responsible for the generation of a sAHP current was severely reduced compared to the wild-type hippocalcin variant. This reduction led to the inability of the mutated hippocalcin variant N75K to generate additional sAHP current to one generated by the translocation of the endogenic wild-type hippocalcin. In contrast, the expression of wild-type hippocalcin caused that current to rise. Yet this mutation N75K does not affect the myristoyl switch, nor the spatial distribution of the hippocalcin binding to plasma membrane. Mutated hippocalcin variant T71N did not exhibit any significant changes in the translocation. In general, the hippocalcin mutation N75K causes increased neuronal excitability due to reduced sAHP and its inhibition effect in response to a series of action potentials bursts and □-stimulation. It follows that the postsynaptic currents which occur subsequent to the action potential burst possess an increased likelihood of inducing further action potentials in the affected neurons. This phenomenon may serve as the fundamental cause of the motor symptoms observed in the dystonia DYT2 movement disorder.

Державний реєстраційний номер ДіР: 0112U001475, 0113U007273, 0118U007345

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки: Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності: Впровадження нових технологій та обладнання для якісного медичного обслуговування, лікування, фармацевтики

Підсумки дослідження: Теоретичне узагальнення і вирішення важливої наукової проблеми

Публікації:

- Cherkas V., Grebenyuk S., Osypenko D., Dovgan A. V., Grushevskyi E. O., Yedutenko M., Sheremet Y., Dromaretsky A., Bozhenko A., Agashkov K., Kononenko N. I., Belan P. Measurement of intracellular concentration of fluorescently-labeled targets in living cells. PLOS ONE. 2018. 13(4): e0194031
- Osypenko D., Dovgan A., Kononenko N., Dromaretsky A., Matvieienko M., Rybachuk O., Zhang J., Korogod S., Venkataraman V., Belan P. Perturbed Ca2+-dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. Neurobiology of Disease. 2019. 132: 104529
- Krotov V., Tokhtamysh A., Kopach O., Dromaretsky A., Sheremet Y., Belan P., Voitenko N. Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. Frontiers in Cellular Neuroscience.

2017. 11(342): 1-12

- Войтенко Н. В., Риков С. О., Шаргородська І. В., Агашков К. С., Краснякова М. Є., Ніколайчук Н. С., Рибачук О. А., Забенько Є. Ю., Дромарецький А. В. Кількісний аналіз вітальності гангліонарних клітин сітківки при експериментальній глаукомі низького тиску у щурів: ефект терапії поляризованим світлом. Архів офтальмології України. 2017. 5(3): 28-36
- Агашков К., Краснякова М., Ніколайчук Н., Рибачук О., Забенько Є., Дромаре- цький А., Шаргородська І., Риков С., Войтенко Н. Вплив поляризованого світла на життєздатність гангліонарних клітин сітківки при глаукомі низького тиску у щурів. Фізіологічний журнал. 2018. 64(4): 41-50

Наукова (науково-технічна) продукція: методи, теорії, гіпотези

Соціально-економічна спрямованість: поліпшення якості життя та здоров'я населення, ефективності діагностики та лікування хворих

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації: Впровадження не планується

Зв'язок з науковими темами: 0112U001475, 0113U007273, 0118U007345, 0124U001556

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Білан Павло Володимирович
2. Pavlo V. Bilan

Кваліфікація: д. б. н., професор, 03.00.02

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417093

Місцезнаходження: вул. Богомольця, буд. 4, Київ, 01024, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Жолос Олександр Вікторович
2. Oleksandr V. Zholos

Кваліфікація: д.б.н., професор, 03.00.02

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Код за ЄДРПОУ: 02070944

Місцезнаходження: вул. Володимирська, буд. 60, Київ, 01033, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Міністерство освіти і науки України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Шатурський Олег Ярославович
2. Oleg Y. Shatursky

Кваліфікація: д. б. н., старший науковий співробітник, 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи: Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417288

Місцезнаходження: вул. Леонтовича, буд. 9, Київ, 01054, Україна

Форма власності: Державна

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR:

Рецензенти

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради	Веселовський Микола Сергійович
Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні	Веселовський Микола Сергійович
Відповідальний за підготовку облікових документів	Шиш Анжела Михайлівна
Реєстратор	УкрІНТЕІ

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності

Юрченко Тетяна Анатоліївна