

# **ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА**

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

Романова Артура Костянтиновича

## **«РОЛЬ ПРОТОН-ЧУТЛИВИХ ІОННИХ КАНАЛІВ У МОДУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ НЕЙРОННИХ МЕРЕЖ ГІПОКАМПА ЩУРІВ У НОРМІ ТА ЗА УМОВ ПАТОЛОГІЧНОЇ СИНХРОНІЗАЦІЇ»**

представлену на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних

наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

Дисертаційна робота А.К.Романова має за мету визначення ролі протон-чутливих іонних каналів типу 1a у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів.

### **Актуальність обраної теми досліджень:**

Сучасні фармакологічні засоби розробляються такими, щоб вони діяли на конкретні молекулярні мішені і, таким чином, впливали на конкретні біологічні механізми, які діють на клітинному та тканинному рівнях. Ефективність та вибірковість дії таких препаратів залежить від розуміння місця та ролі обраних молекулярних мішеней у метаболізмі у нормі та у патології. Пошук нових ефективних молекулярних мішеней є актуальною проблемою, зокрема, у лікуванні епілепсії. Особливо, це важливо з огляду на існування численних обмежень та протипоказань для існуючих препаратів, а також через існування фармакорезистивної форми цього захворювання.

Вибір протон-чутливих іонних каналів (ASIC – acid-sensing ion channel) у якості об'єкта досліджень є цікавим та виправданим з декількох причин: 1) іонні канали цього типу поширені у всіх тканинах ссавців, зокрема, як у клітинах периферичної, так і центральної нервової системи (Cristofori-Armstrong and Rash, *Neuropharmacology*. 2017). 2) Ці канали є чутливими до рН середовища, а, згідно з даними з літератури, багато патологічних процесів у нервовій системі супроводжуються зміною рН. 3) Аналіз наукових публікацій, які стосуються вивчення ASIC демонструє зростаючий тренд протягом останнього десятиліття. Ці факти зумовлюють інтерес до вивчення ролі цих каналів у збудливості нейронів та їх мереж у ЦНС, зокрема, з ціллю використанні їх у якості молекулярних мішеней для фармакологічної терапії патологічних станів, зокрема, епілепсії.

Таким чином, дисертація Романова А.К. відповідає вимогам актуальності для наукового дослідження, результати якого мають як теоретичну, так і практичну цінність.

### **Задачі та методи дослідження:**

Задля досягнення поставленої мети, у дисертаційній роботі, Романовим А.К. були вирішені наступні науково-дослідні задачі:

1. Визначені параметри перфузування та оксигенації для дослідження епілептиформної активності у пірамідному шарі нейронів гіпокампа.
2. Досліджено епілептиформні події, які генеруються у гіпокампі відповідно до низько-магнієвої моделі епілептиформної активності.
3. Досліджено генерацію іктальних та інтеріктальних явищ у CA3, CA1 та DG зонах вентральної частини гіпокампа в умовах низько-магнієвої моделі епілептиформної активності.
4. Досліджено ефект фармакологічної блокади ASIC на епілептиформні явища в умовах низько-магнієвої моделі індукції епілептиформної активності.
5. Досліджено ефект від блокування ASIC в умовах 4-АП моделі індукції епілептиформної активності.
6. Досліджено вплив ASIC на генерацію потенціалів дії у окремому нейроні.
7. Досліджено роль ASIC у генерації спонтанної збуджуючої та гальмівної синаптичної активності нейронів гіпокампа.

Ці задачі вирішувалися методами електрофізіологічної реєстрації у зрізах гіпокампа з використанням методик петч-клемп у конфігурації «ціла клітина» та селл-аттач, реєстрації потенціалів дії нейронів гіпокампа та електрофізіологічної реєстрації польових потенціалів гіпокампа, оцінки впливів фармакологічних агентів, статистичної обробки результатів. Для вивчення ролі ASIC, епілептиформна активність у зрізах гіпокампа викликала фармакологічно за методами низько-магнієвої та 4-амінопіридинової моделей. Такий підхід забезпечує достовірність отриманих результатів і, як наслідок, обґрунтованість та надійність зроблених на їх підставі висновків.

#### **Дотримання норм біоетики:**

У основу дисертаційної роботи лягли результати експериментальних досліджень, які проводилися із використанням піддослідних щурів. При проведенні дослідів дотримувалися положення Конвенції з біоетики Європейської Ради (1997 року), Гельсінської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996 року), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 рік), загальні етичні принципи наукових досліджень, ухвалені Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 року) та Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006 року), що було підтверджено комітетом біомедичної етики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця.

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

Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках 3-х наукових тем.

#### **Наукова новизна, теоретичне та практичне значення отриманих результатів:**

За результатами виконання дисертаційного дослідження автором було отримано як ряд нових даних, так і такі результати, що суттєво доповнюють існуючі знання та уявлення щодо ролі та властивостей ASIC у збудливості нейронів та генерації епілептиформної

активності у нейронних мережах гіпокампа, методики проведення електрофізіологічного експерименту.

Зокрема:

- В роботі вперше досліджено вплив блокування ASIC на роботу гіпокампальних мереж в умовах експериментальних моделей викликаної епілептиформної активності з використанням новітнього блокатора субодиночці ASIC1a сполуки 2-охо-2H-chromene-3-carboxamidine derivative (5b).
- В роботі вперше було продемонстровано, що вилучення ASIC1a з каскаду синаптичної провідності не має впливу на збуджувальну синаптичну активність, але значно підвищує частотні характеристики гальмівної активності.
- Вперше продемонстровано, що обумовлене блокуванням ASIC1a зміщення балансу між гальмуванням та збудженням призводить до зменшення загальної збудливості та має протиепілептичний ефект.

**Теоретична цінність** отриманих результатів полягає у поглибленні знань про роль та місце ASIC1a у модуляції епілептиформної активності. Це дає змогу глибше зрозуміти клітинні та мережеві механізми роботи ASIC під час розвитку і поширення епілептичних нападів у структурах гіпокампа як одного з головних фокусів епілептичної активності.

**Практична цінність** роботи полягає у встановленні впливу ASIC на генерацію спонтанної синаптичної активності у пірамідних нейронах гіпокампа. Цей факт має враховуватися при розробці нових стратегій коригування патологічних процесів, які супроводжуються зміною рівня зовнішньоклітинного рН. Також, встановлення ролі ASIC у генерації епілептиформної активності може бути використано при розробці та вдосконаленні протиепілептичних препаратів.

#### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення дисертаційної роботи опубліковані у 5 наукових статтях у фахових наукових журналах, затверджених МОН України, з яких одна стаття – у науковому виданні, віднесеному до першого квартилю (Q1) та одна стаття у виданні, віднесеному до другого квартилю (Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 тез доповідей на міжнародних конференціях.

#### **Структура і обсяг дисертації:**

Дисертаційна робота Романова А.К. оформлена відповідно до «Вимог до оформлення дисертації», затверджених наказом МОН України №40 від 12.01.2017 р. Роботу викладено на 134 сторінках, що становить 6,1 авторського аркуша. З них основний зміст становить 106 сторінок та включає в себе титульну сторінку, анотацію, список публікацій за темою дослідження, зміст, перелік умовних скорочень, вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати досліджень, обговорення результатів дослідження, висновки. Список літератури складається з 212 цитованих джерел на 28 сторінках. Дисертаційна робота проілюстрована 31 рисунком, які дають цілісне уявлення як про методику проведення

експериментів, так і про якість отриманих даних. Крім того, робота містить важливу інформацію щодо методик проведення експериментів у 5 таблицях.

У вступі автор окреслює проблематику, пов'язану з епілепсією, зокрема, її поширеність та труднощі із підбором фармакологічних препаратів для її лікування. Цим обґрунтовується актуальність та важливість пошуку та дослідження нових молекулярних мішеней для терапії епілептичних станів. Формулюється мета дослідження та перелік задач, які вирішувалися задля досягнення поставленої мети, визначаються об'єкт та предмет дослідження, перелічуються використані методи дослідження, визначається наукова новизна, теоретична та практична цінність отриманих результатів. Відзначається зв'язок роботи з науковими програмами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вона виконувалася, особистий внесок здобувача, апробації матеріалів дисертаційного дослідження, публікація матеріалів дисертації у наукових виданнях та структура роботи.

**Розділ 1** (*Огляд літератури*) складається з 6 підрозділів, у яких автор висвітлює сучасні концепції розуміння механізму розвитку епілепсії, патогенез та наслідки розвитку епілепсії, зокрема, роль ГАМК та глутамату та їх рецепторів у цих процесах, причини та наслідки підкислення позаклітинного середовища у цих процесах. Більш детально автор висвітлює наявні знання про кислото чутливі іонні канали (ASIC) та їх модулятори у ЦНС, зокрема, знання про їх субодиниці, їх експресію та функції у нейронах, у синаптичній передачі та у гіпокампі в цілому, їх відомі функції та електрофізіологічні властивості. Наведений у дисертації аналіз літературних джерел має пряме відношення до теми дисертаційної роботи та підкреслює актуальність поставлених у роботі задач.

**Розділ 2** (*Матеріали і методи*) також складається з 6 підрозділів. У цьому розділі автор підкреслює, що усі досліді на піддослідних тваринах проводилися виключно у відповідності та із дотриманням положень конвенцій з біоетики, про захист піддослідних тварин, згідно із загальними етичними принципами наукових досліджень та у відповідності до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Далі автор описує процедуру підготовки свіжоізольованих зрізів гіпокампа щурів, методику індукції та реєстрації епілептиформної активності відповідно до 4-амінопіридинової та низько-магнієвої моделей. Детально описуються обладнання та методики проведення електрофізіологічної реєстрації (різновиди методики «петч-клемп») та використання оптичних систем (мікроскопу з світлодіодною підсвіткою) для візуалізації клітин у зрізах, які використовувалися при виконанні експериментальної частини роботи, методики детектування, комп'ютерної програмної обробки та аналізу (у тому числі, статистичного) отриманих даних. У останньому підрозділі наведений склад розчинів, які використовувалися при проведенні електрофізіологічних експериментів.

**Розділ 3** (*Результати досліджень*) складається з 8 підрозділів, у яких наведені основні результати досліджень відповідно до визначених задач дисертаційної роботи. А саме:

- У підрозділі 3.1 автор наводить результати експерименту, який проводився із використанням 4-амінопіридинової моделі індукції епілептиформної активності, та ціллю якого було встановлення оптимальних експериментальних умов які будуть найбільш точно відповідати фізіологічним показникам. Окрім вирішення основної задачі, автор також звертає увагу на те, що дані, отримані у цьому експерименті

вказують на прямий зв'язок між вмістом кисню (оксигенацією) у зрізі мозку та потужністю індукованої епілептиформної активності.

- У підрозділі 3.2 автор наводить дані експериментальних досліджень епілептиформних подій, генерованих у гіпокампі відповідно до низько-магнієвої моделі. Ціллю цих експериментів було порівняння спонтанної епілептиформної активності у дорзальних та вентральних зрізах області CA1. За отриманими даними автор робить висновок, що вентральна частина гіпокампа є більш вразливою до генерації фармакологічно індукованих епілептиформних явищ порівняно з дорзальною. На думку автора, це може бути пояснено різницею в експресії НМДА- або AMPA-рецепторів.
- У підрозділі 3.3 автор описує результати дослідження генерації іктальних та інтеріктальних явищ у зонах CA3, CA1 та у зубчастій звивині вентральної частини гіпокампа. За отриманими даними, автор робить висновок, що іктальні події починаються у зоні CA1 гіпокампа та поширюються на зону CA3 та зубчасту звивину (DG), тоді як інтеріктальні беруть свій початок у зоні CA3 і переходять в DG.
- У підрозділах 3.4 та 3.5 автор описує ефект фармакологічної блокади ASIC на епілептиформні явища в умовах низько-магнієвої (3.4) та 4-амінопіридинової (3.5) моделей. Згідно до отриманих даних автор відзначає, що у обох серіях експериментів унаслідок дії блокатора було зафіксовано достовірне зниження як частотних, так і амплітудних характеристик епілептиформної активності.
- У підрозділі 3.6 наведено результати дослідження ролі ASIC у генерації потенціалів дії. Автор звертає увагу на те, що при блокуванні роботи ASIC, частота генерації потенціалів дії знижується, а при вимиванні блокатора, частота генерації потенціалів дії нейронів частково підвищувалась, але не поверталася до контрольного рівня.
- У підрозділах 3.7 та 3.8 автор описує результати експериментів, які мали за мету визначити роль ASIC у генерації спонтанної збуджувальної та гальмівної синаптичної активності нейронів гіпокампа відповідно. Це мало допомогти з'ясувати безпосередні механізми впливу ASIC на епілептиформну активність. Згідно до отриманих даних, автор зробив висновки, що фармакологічна блокада ASIC *in vitro* не призводила до зміни частоти генерації спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів, та навпаки, значною мірою підвищувала частоту гальмівних постсинаптичних струмів (ГПС) пірамідних нейронів гіпокампа. Було отримано додаткове свідчення про те, що ефект підвищення частоти ГПС не є НМДА-залежним

**Розділ 4 (Обговорення результатів дослідження)** складається з 5 підрозділів, у яких автор підсумовує результати, наведені у попередньому розділі, пояснює логіку та зв'язок між проведеними дослідженнями та робить висновки, які відповідають поставленим у дисертаційному дослідженні задачам та обумовлюють наукову новизну отриманих результатів.

### **Зауваження та запитання:**

Під час розгляду дисертаційної роботи Романова А.К. *«Роль протон-чутливих іонних каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів у нормі та за умов патологічної синхронізації»* виникло декілька зауважень.

1. При читанні тексту дисертації звертає на себе увагу певна повторюваність деяких тез, відомостей та посилань, які за логікою структури роботи мали б міститися лише у розділі 1 «Огляд літератури». Втім, такі відсилки до вже відомих з літератури фактів зустрічаються в тому числі у розділах «Методи» та «Результати досліджень». Інколи такі блоки інформації повторюють вже наведені у «Огляді літератури» відомості.
  2. Також звертає на себе увагу дещо вільне використання автором при характеризованні зареєстрованих сигналів певних термінів та понять, які, втім, мають чітке визначення у теорії числової обробки сигналів, теорії автоматичного управління та статистиці.
    - 2.1. Наприклад, у підрозділі 3.1 автор характеризує та порівнює зареєстровані сигнали та їх зміни, терміном «потужність» які, втім, мають розмірність «мкВ», що є невірним з точки зору визначення терміну «потужність сигналу» у теорії числової обробки сигналів.
    - 2.2. У розділі 3 автор багато разів оперує поняттями «частота» та «ймовірність» щодо певних подій, які спостерігаються у зареєстрованих сигналах. Втім, відсутня визначеність: що саме мається на увазі під цими термінами. Адже для кінцевого за часом фрагменту стохастичного сигналу ймовірність подій лише може бути оцінена через відносну частоту цих подій.
    - 2.3. Також у розділі 3.1 (останній абзац на стор. 68) автор відзначає, що було показано «позитивний зв'язок» між потужністю епілептиформної активності, індукованої 4-амінопірідином та вмістом кисню у зрізі мозку. З тексту незрозуміло, чи то автор мав на увазі «позитивний зворотній зв'язок» (термін, введений у теорії автоматичного управління), чи «позитивний кореляційний зв'язок» (термін, введений у статистиці).
- Підсумовуючи: не зважаючи на те, що порівняння параметрів зареєстрованих сигналів є ключовим інструментом обробки даних експериментів, у розділі «Матеріали і методи» лише вказана назва програмного засобу обробки сигналів, але немає чіткого та ясного визначення використаних термінів та пояснення математичної процедури розрахунку тих чи інших показників. Це ускладнює розуміння отриманих результатів людиною, яка не знайома з використаним програмним засобом.
3. Також, на мою думку, робота б значно виграла, якби у розділах «Результати» та «Обговорення» автор додав би діаграми у вигляді блок-схеми у тих підрозділах дисертації, де пояснюється зв'язок між певними подіями, спостереженнями та механізмами на рівні молекул, клітин чи відділів гіпокампу. Це б значно полегшило розуміння розкритих у роботі механізмів та зроблених висновків.
  4. Також у тексті присутня невелика кількість друкарських помилок, які, втім, не заважають розумінню контексту дисертаційної роботи.

Під час розгляду дисертаційної роботи Романова А.К. виникли такі запитання до автора:

1. У назві та меті роботи автор підкреслює інтерес саме до мережевого аспекту впливу ASIC на епілептиформну активність, що є зрозумілим та логічним з огляду на те, що епілептиформна активність виникає не на рівні окремого нейрону, а у їх мережах. Втім, усі експерименти проводилися на зрізах мозкової тканини, у яких кількість нейронів обмежена, а багато з них пошкоджені або зруйновані під час процедури отримання зрізу. Тож, цікаво почути оцінку автора дисертації з приводу того, у якій мірі зрізи мозкової тканини, використані ним у експериментах, можна вважати «фізіологічними умовами» та адекватною моделлю подій та явищ, які можливі лише у нейронних мережах?
2. У підрозділі 3.6 «Дослідження ролі ASIC у генерації потенціалів дії» автор зазначає, що «Для проведення цієї серії експериментів клітини обиралися випадковим чином з пірамідного шару зони CA1 гіпокампа». То чи варто це розуміти так, що роль ASIC у генерації потенціалів дії не залежить від типу нервової клітини та «коктейлю» мембранних провідностей? Адже у підрозділі 4.4 автор зазначає, що «ASIC – не єдині іонні канали, що експресуються у нейронах, та функція яких залежить від позаклітинного рН», а у підрозділі 4.5 робиться висновок, що «наші результати не продемонстрували залучення ASIC у процес генерації спонтанних збуджувальних постсинаптичних струмів. Водночас ми виявили суттєве зростання гальмівних постсинаптичних струмів внаслідок блокування ASIC». З обговорення цих підрозділів залишається не до кінця зрозумілою роль та специфічність саме ASIC у генерації потенціалів дії у порівнянні з іншими каналами у збудливій мембрані різних нейронів.

#### **Висновок:**

Автореферат та опубліковані за темою дисертації наукові праці повно і відповідно відображають зміст дисертаційної роботи. Матеріали дисертації доповідались автором на вітчизняних та міжнародних конференціях, що у купі з якістю публікацій визначає високий рівень фахової апробації отриманих наукових результатів.

Загалом, Романов А.К. проявив себе компетентним науковцем-дослідником, який продемонстрував обізнаність у предметній області та вміння працювати з науковою літературою по досліджуваній проблемі, опанував сучасні технічно складні методи реєстрації та аналізу електричної активності поодиноких нейронів та нейронних мереж у зрізах, методи статистичної обробки отриманих результатів, проявив здатність до критичного аналізу отриманих результатів. У описі результатів дисертаційного дослідження особливо привертає увагу обізнаність автора на методиці проведення електрофізіологічних експериментів, його вміння обирати методики експерименту, адекватні до поставленої задачі, аналізувати отримані дані та робити висновки, що свідчать про високий рівень кваліфікації саме як дослідника-експериментатора.

Враховуючи вище наведене, вважаю, що дисертаційна робота Романова А.К. *«Роль протон-чутливих іонних каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів у нормі та за умов патологічної синхронізації»* є завершеним науковим дослідженням, яке містить раніше не захищені наукові положення та отримані автором нові науково обґрунтовані результати, які розв'язують конкретну наукову задачу

експериментального визначення ролі протон-чутливих іонних каналів типу 1a у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів.

Незважаючи на перелічені зауваження, нові наукові і практичні результати, отримані дисертантом, та зроблені з них висновки сумнівів не викликають. Дисертаційна робота Романова Артура Костянтиновича *«Роль протон-чутливих іонних каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів у нормі та за умов патологічної синхронізації»* є цілісною та в цілому відповідає чинній Постанові Кабінету Міністрів України №567 від 24.07.2013р. (із змінами) «Про затвердження Порядку присудження наукових ступенів» та паспорту спеціальності 03.00.02 «Біофізика» (галузь: біологічні науки), а її автор заслуговує присудження наукового ступеня кандидат біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика (галузь: біологічні науки).

10.01.2021 р.

Офіційний опонент

доцент кафедри клінічних дисциплін

ПЗВО Дніпровський інститут медицини та громадського здоров'я

кандидат фіз.-мат. наук (спеціальність 03.00.02 - біофізика), доцент Каспиржний А.В.

*А.В. Каспиржний*

*Підпис засвічує*  
*Ректор*



*А.В. Каспиржний*