

# ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

про науково-практичну цінність дисертаційної роботи

**ФЕДОРЮК МИХАЙЛО ПЕТРОВИЧА**

*«Роль протон-чутливих іонних каналів в електричній активності  
гіпокампа та поведінці щурів у моделі індукованої епілепсії»*

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

## Актуальність проведених досліджень

Частота епілепсії в популяції близько 1%. При правильно підбраному лікуванні приблизно у 70% хворих настає ремісія або спостерігається зменшення частоти нападів більш ніж на 50%, однак 30% хворих залишаються фармакорезистентними. Багаточисленні антиепілептичні препарати мають різні механізми дії, які призводять до нормалізації трансмітерного балансу в глутаматергічній та ГАМКергічній системах, сприяють поляризації клітинних мембран епілептичних нейронів. Епілепсія потребує довготривалої терапії, тому на якість життя хворих негативно впливають не тільки епілептичні напади, но і побічні ефекти антиепілептичної терапії. «Ідеальний антиконвульсант» повинен мати широкий спектр терапевтичної активності, лінійну і передбачену фармакокінетику, мінімальні побічні ефекти, не впливати негативно на пізнавальні функції, бажана відсутність феномену «аутоіндукції» та «звикання», потрібен широкий вибір лікарських форм та доступна ціна.

Нажаль, «ідеального антиконвульсantu» поки що не існує, тому подальші дослідження з метою створення нових напрямків антиконвульсантної терапії залишаються актуальними.

Дисертаційне дослідження присвячене вивченню ролі протон-чутливих іонних каналів (ASICs) у модуляції епілептиформної активності гіпокампа щурів. Відомо, що протон-чутливі іонні канали ASICs широко розповсюджені як в периферичній (ПНС) так і в центральній нервовій системі (ЦНС) хребетних тварин. Незважаючи на те, що з моменту відкриття ASICs пройшло чотири десятиріччя, повна картина їх функціональної ролі у периферичній та центральній нервовій системі і досі залишається нез'ясованою.

Активация ASICs спостерігається при багатьох неврологічних та психічних розладах, в тому числі може відігравати певну роль у генерації та підтримці епілептичної активності. Доведено, що під час епілептичного нападу спостерігається локальне зміщення рН в сторону більш кислої реакції, що призводить до активації протон-чутливих каналів та, як наслідок, до підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію і до загибелі нейронів. Отже, фармакологічний вплив на протон-чутливі іонні канали є перспективним шляхом протиепілептичної терапії.

Поряд з цим, ASICs залучені до нормальних фізіологічних процесів пам'яті, навчання тощо, а отже потенційний фармакологічний агент має змінювати функції ASIC-каналів за умов патології, при цьому не впливаючи на їх функцію у нормі. Автор дисертації у своїй роботі пропонує застосувати селективний блокатор ASIC-каналів – сполуку 5b, для визначення його впливу на епілептиформну активність гіпокампа та поведінкові феномени в експериментальній моделі індукованої епілепсії.

Регуляція активності протон-чутливих іонних каналів може бути корисною для корекції епілептичної активності, а також депресивних та тривожних станів.

Таким чином, робота Федорук М.П. відповідає актуальним напрямкам сучасних біомедичних досліджень, а її значення має як теоретичні, так і практичні складові.



## Наукова новизна отриманих результатів.

В процесі виконання дисертаційного дослідження автором були отримані цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють існуючі уявлення щодо впливу фармакологічної блокади протон-чутливих іонних каналів на епілептиформну активність гіпокампа щурів у моделі індукованої епілепсії, визначені наслідки інгібування протон-чутливих іонних каналів на поведінку щурів у моделі індукованої епілепсії, виявлені електроенцефалографічні зміни, що відбуваються внаслідок інгібуючої дії блокатора на протон-чутливі іонні канали.

Зокрема в роботі були вперше продемонстровані:

- 1) блокада провідності ASIC антагоністом ASICs 5b пригнічує епілептиформну активність нейронів зони CA1 гіпокампа *in vivo* в умовах каїнатної моделі епілепсії;
- 2) розроблено бездротовий пристрій для реєстрації електричної активності гіпокампа щурів, який має значні переваги в порівнянні з аналогами;
- 3) блокування активності ASIC-каналів призводить до зниження домінуючої частоти тета-ритму та загального рівня локомоторної активності в тесті “відкрите поле”;
- 4) поведінка тварин після індукції епілепсії у тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт” нормалізується внаслідок пригнічення ASIC з використанням сполуки 5b, водночас таке пригнічення функції ASIC суттєво впливає на рівень локомоторної активності тварин у даному тесті;
- 5) пригнічення функції ASIC з використанням сполуки 5b призводить до нормалізації навчання, зумовленого страхом і зниженого внаслідок епілепсії.

## Теоретичне та практичне значення роботи.

Результати, отримані в роботі, мають здебільшого фундаментальне значення, оскільки демонструють залучення ASIC-каналів до регуляції надмірної синхронної активності нейронів гіпокампа.

Практичне застосування результатів цієї роботи може допомогти у розробці антиепілептичних препаратів, а також у проектуванні пристроїв моніторингу та реєстрації електроенцефалограми у тварин.

Рукопис виконано відповідно до вимог, які висуваються до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, містить усі необхідні розділи. За результатами роботи було опубліковано дві статті у фахових наукових журналах, затверджених ВАК України, у тому числі одна стаття у науковому виданні, віднесеному до першого квартилю відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, шість тез доповідей у матеріалах вітчизняних і міжнародних наукових конференцій та з'їздів та два патенти.

Зміст дисертаційної роботи визначається логічністю побудови матеріалу дисертації, а також зрозумілістю його викладення. Представлене дослідження поєднує широкий спектр підходів і експериментальних методів, і є завершеною науковою роботою.

#### **Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи**

В рамках виконання дисертаційного дослідження автором було розроблено і запатентовано прилад для бездротової реєстрації електроенцефалограми головного мозку щурів, який має ряд суттєвих переваг перед його аналогами: однополярне акумуляторне живлення, сучасну систему пам'яті, підвищену жорсткість та надійність приладу.

Для виконання даної роботи була проведена реєстрація електричної активності гіпокампа у іммобілізованих щурів до та під час проведення поведінкових тестів. Аналіз електричної активності гіпокампа здійснювався за допомогою пакета Matlab (MathWorks, Inc). Спектральну густину потужності ЕЕГ визначали за алгоритмом Welch з 10-секундними епохами та порівнювали в діапазоні 1-50 Гц. Використовувалась модель індукованої епілепсії та поведінкові тести: "відкрите поле", "піднятий хрестоподібний лабіринт", поведінковий тест на дослідження пам'яті, що зумовлена



страхом. Наукові положення дисертаційної роботи базуються на висновках по кожній серії проведених експериментів, їх статистичному аналізі і обговоренні. Висновки в дисертаційній роботі відповідають поставленим цілям та завданням. На основі отриманих даних запропоновано гіпотези, щодо ролі ASIC-каналів у поведінкових змінах та протиепілептичних ефектах блокування ASIC-каналів у моделі індукованої епілепсії.

Загалом Федорюк М.П. засвоїв технічно складні методи реєстрації та аналізу електричної активності гіпокампу, вивчив наукову літературу по досліджуваній проблемі та здатний до критичного аналізу отриманих результатів.

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

Дисертаційна робота виконана в рамках наукової програми відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України «Молекулярно-генетичні та фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343); в рамках проекту науково-дослідних робіт для молодих вчених «Механізми розвитку епілептиформної активності та властивості синаптичної пластичності гіпокампа в умовах порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру» (№ державної реєстрації 0119U102351)

#### **Структура і обсяг дисертації**

Дисертаційна робота Федорюк М.П. представлена за загально-прийнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 124 сторінках, що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літературних даних, опис матеріалів і методів досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки та список цитованої літератури (121 джерело). Робота проілюстрована 44 рисунками.



У вступі окреслено коло питань стосовно розповсюдження та ролі протон-чутливих іонних каналів ASICs в фізіологічних та патологічних процесах, а також відомості про селективний блокатор ASIC-каналів – сполуку 5b, на основі чого обґрунтовано вибір теми дослідження, сформульовано мету та завдання дослідження, пояснений зв'язок роботи з науковими програмами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вона виконувалася, зазначено наукову новизну, теоретичне та практичне значення цього дослідження, а також представлені відомості щодо особистого внеску здобувача і апробації матеріалів дисертаційного дослідження.

В розділі 1 (Огляд літератури) автор висвітлює сучасний стан досліджуваної проблематики. Він містить 12 підрозділів, в яких автор послідовно розглядає питання історії відкриття ASICs, розподіл протон-чутливих іонних каналів в тканинах, структуру, функції, питання регулювання та фармакології, залучення ASICs до синаптичної пластичності та формування пам'яті, страху та тривожності, больових відчуттів, механочутливості, розглядає роль ASICs у нейродегенеративних захворюваннях та епілепсії.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) пояснений метод реєстрації електрокортикограми у імібілізованих щурів до та під час проведення поведінкових тестів, наведені дані стосовно розробки бездротового пристрою реєстрації електрокортикограми головного мозку щурів, описана літій-пілокарпінова модель індукованої епілепсії, поведінкові тести: “відкрите поле”, “піднятий хрестоподібний лабіринт”, поведінковий тест на дослідження пам'яті, що зумовлена страхом.

Всі експериментальні методи є адекватними меті і завданням дослідження.

В розділі 3 (Результати дослідження) та розділі 4 (Обговорення результатів) наведені та проаналізовані основні результати досліджень. У логічній послідовності автор проводить детальний аналіз даних, отриманих під час проведення поведінкових тестів: “відкрите поле”, “піднятий



хрестоподібний лабіринт”, тест на дослідження пам’яті, що зумовлена страхом. Місцеве введення каїнату в гіпокамп викликало епілептиформну активність (ЕА) високої частоти. Наступне застосування розчину сполуки 5b, після 20 хв стійкої епілептиформної активності призвело до зменшення частоти розрядів ЕА. Блокування активності протон-чутливих іонних каналів сполукою 5b у великих концентраціях призвело до зниження домінуючої частоти гіпокампального тета-ритму та загального рівня локомоторної активності щурів в тесті “відкрите поле”. Поведінка тварин після індукції епілепсії у тесті “піднятий хрестоподібний лабіринт” нормалізувалась внаслідок пригнічення протон-чутливих іонних каналів використанням сполуки 5b, водночас таке пригнічення функції ASIC суттєво впливало на рівень локомоторної активності тварин у даному тесті. Фармакологічна блокада протон-чутливих іонних каналів у щурів значно відновлювала порушене внаслідок індукції епілепсії емоційне навчання, що зумовлене страхом.

Привертає увагу значна кількість рисунків, які детально ілюструють кожен етап дослідження.

Висновки роботи сформульовані чітко, відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

В авторефераті дисертаційної роботи по кожному розділу викладені і проілюстровані основні результати, зроблені висновки, а в анотації роботи стисло викладена її суть.

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

1. Звертає на себе увагу переважання обсягу розділу «Літературний огляд» - 43 стор. у порівнянні з обсягом власних досліджень. «Матеріали та методи дослідження» - 14 стор., «Результати дослідження» - 17 стор., «Обговорення результатів» - 7 стор.
2. В дисертації зустрічаються окремі стилістичні помилки та неточності.
3. В розділах «Матеріали та методи дослідження» та «Результати

дослідження» описані дві моделі індукованої епілептиформної активності: літій-пілокарпінова та каїнатна, але відсутнє пояснення, чому використовуються різні моделі для поведінкових тестів та реєстрації електроенцефалограми. Хотілося б почути пояснення дисертанта.

4. В розділі «Матеріали та методи дослідження» не позначена кількість щурів в групах дослідження та контролю.
5. Є помилка в визначенні ритму 4-10 Гц як  $\theta$ -ритму, тоді як відомо, що ритм 8-13 Гц – це альфа-ритм.
6. В розділі 3.2.2 порівнюється сумарна потужність тета-діапазону у групі контролю та дослідній, але відсутнє пояснення, що таке сумарна потужність та як її розраховали. Чи може дисертант відповісти на це запитання?
7. Незрозумілу назву має рис. 3.3 «Вплив сполуки 5b на частоту індукованих каїнатом *нападів у гіпокампі* щурів (\*\* $p < 0.005$ ,  $n = 7$ ). Результати представлені як середнє значення + стандартна похибка середнього». Але стандартна похибка середнього на рис. та в тексті також відсутня.
8. Розділ 3.2. «Для порівняння пов'язаних вибірок використовували непараметричний критерій Вілкоксона, для незалежних вибірок — критерій Манна-Вітні. Результати представлені у вигляді  $Me [LQ; HQ]$ , де  $Me$  – медіана,  $LQ$  – нижній квартиль,  $HQ$  – верхній квартиль розподілу». Але все це, крім назви, в дисертації не представлено.

Висловлені зауваження та пропозиції можуть бути предметом обговорення і суттєво не впливають на позитивну оцінку даної дисертаційної роботи.



## Висновок:

Згідно з пунктами 9, 11, 12, 13 "Порядку присудження наукових ступенів", затвердженого постановою Кабінету Міністрів України N567 від 24 липня 2013 р. (зі змінами), вважаю, що за своєю актуальністю, науковою новизною, об'ємом проведених досліджень, обґрунтованістю та достовірністю зроблених узагальнень і висновків, дисертаційна робота Федорюк Михайло Петровича

*«Роль протон-чутливих іонних каналів в електричній активності гіпокампа та поведінці щурів у моделі індукованої епілепсії»* 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

доцент кафедри неврології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця

кандидат медичних наук Крилова В.Ю.

*В.Ю. Крилова*

