

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

**доктора біологічних наук, професора, завідувача кафедри біофізики
та медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Жолоса Олександра Вікторовича**

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**

Актуальність проведених досліджень

Нейрологічні захворювання різного генезу часто супроводжуються зниженням рН позаклітинного середовища, що є однією з вагомих причин загибелі нейронів. Дослідження механізмів цього явища, що відоме як ацидотоксичність, є актуальним, адже краще розуміння сигнальних шляхів буде сприяти розробці терапевтичних заходів для покращення нейропротекції. У цій галузі особливу увагу дослідників привертає група катіон-селективних іонних каналів, які є специфічними сенсорами протонів і які дістали назву протон-чутливих іонних каналів (Acid-sensing ion channels - ASICs). Серед них для нейронів мозку особливо це стосується підтипу ASIC1a, адже ці канали переважно експресуються в ЦНС. Важлива роль ASIC1a в нейропротекції під час ацидозу була визначена з використанням нокаутних моделей та фармакологічної блокади цих каналів на тваринних моделях інсульту, розсіяного склерозу,

хвороби Гантінгтона, паркінсонізму та травми спинного мозку. Останні дослідження свідчать про те, що загибель нейронів внаслідок активації ASIC1a є не стільки наслідком надмірного входу іонів кальцію до клітини, як вважалось раніше, скільки активації рецептор-спряженої протеїн кінази 1 (RIPK1) шляхом її безпосередньої білок-білкової взаємодії з ASIC1a. Це явище відоме як некроптоз (necroptosis).

Під час та після епілептичних нападів у міжклітинне середовище в значних кількостях вивільнюються молочна та глутамінова кислоти, що створює умови для активації протон-чутливих іонних каналів. Тому тривають дослідження щодо ролі ASIC каналів в патогенезі епілепсії. Таким чином, дисертаційне дослідження Романова А.К., метою якого було вивчення ролі ASIC1a у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів, є обґрунтовано актуальним. При цьому окремо слід підкреслити, що як протон-чутливі іонні канали, так і їх селективний блокатор 5b були відкриті в лабораторії наукового керівника цього дослідження академіка Кришталя О.А. Розвиток цих досліджень у напрямку визначення впливу блокатору ASIC1a 5b (селективний, високоафінний неконкурентний антагоніст ASIC1a ізоформи, який був розроблений в 2015 р.) на епілептоформну активність нейронів гіпокампу безперечно є актуальним і важливим як з теоретичної, так і з практичної точки зору, адже арсенал лікарських препаратів для фармакотерапії такого поширеного захворювання як епілепсія все ще є недостатнім з точки зору їх селективності та ефективності.

Наукова новизна отриманих результатів, їх теоретичне та практичне значення

Автором дисертаційного дослідження було отримано цілий ряд нових даних, або ж таких, які суттєво уточнюють існуючі уявлення, серед яких на особливу увагу заслуговують наступні:

- автором були охарактеризовані відмінності розвитку епілептоформної активності в вентральній та дорзальній частинах гіпокампа щурів;
- вперше було показано, що інгібування ASIC1a за умов безмагнієвої- або 4-AP-індукованої епілепсії пригнічує епілептоформну активність та зменшує частоту спонтанних розрядів потенціалів дії у гіпокампі щурів;
- вперше було показано, що інгібування ASIC1a не впливає на збуджувальні синаптичні потенціали, але натомість підсилює частоту генерації гальмівних постсинаптичних потенціалів.

Останнє є найбільш важливим новим науковим результатом, адже ці дані свідчать про селективне залучення активації ASIC1a у синаптичні механізми гальмування і показує, яким саме чином баланс між збудженням і гальмуванням може зміщуватися в бік гальмування. Іншими словами, розкрито синаптичний механізм протиепілептичного ефекту блокатора 5b, що має як теоретичне, так і практичне значення. Ці дані свідчать про перспективність використання антагоністів ASIC каналів, зокрема ASIC1a підтипу, для фармакологічної корекції епілептичної активності головного мозку.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на застосуванні адекватних поставлених меті і завданням роботи прямих електрофізіологічних реєстрацій електричної активності нейронів гіпокампа з використанням зрізів гіпокампу, фармакологічного аналізу та відповідного статистичного аналізу результатів. Слід окремо підкреслити, що використані в роботі *in vitro* моделі безмагнієвої- або 4-AP-індукованої гострої епілептоформної активності широко

використовуються у наукових дослідженнях такого плану, зокрема вони є корисними для доклінічного скринінгу ефектів протиепілептичних препаратів. Загальновизнаним важливим показником ефективності таких засобів є частотні параметри 4-AP-індукованої електричної активності нейронів, як це і було використано у даному дослідженні.

Важливо відмітити і те, що до початку досліджень дії 5b автор приділив значну увагу суто методичним моментам з метою оптимізації умов проведення експериментів, як це описано в розділі 3.1.

Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості вимірів та їх статистичному аналізі і обговоренні в контексті літературних даних.

Загалом Романов А.К. показав себе компетентним науковцем, добре обізнаним з науковою літературою по досліджуваній проблемі і здатним до фахового і критичного аналізу отриманих ним результатів

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

Дисертаційну роботу виконано згідно з планами науково-дослідних робіт відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України в рамках загального плану НДР відділу та трьох наукових тем, які виконувались протягом 2011-2018 рр.

Структура і обсяг дисертації, оцінка її завершеності та відповідності встановленим вимогам

Дисертаційна робота Романова А.К. побудована за загальноприйнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 134 сторінках, що включає в себе анотацію, список наукових праць по темі дослідження, вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів досліджень, опис та ілюстрації результатів

досліджень, обговорення результатів, висновки та список цитованої літератури (215 джерел). Методи досліджень та отримані результати проілюстровані 32 рисунками і 5 таблицями, які дають повне уявлення про об'єм та якість проведених досліджень.

У вступі наведена інформація щодо поширеності та патогенезу епілепсії і можливого залучення ASIC каналів на основі загальних положень щодо ролі ASIC каналів в різних неврологічних розладах. Автором пропонується слушна гіпотеза щодо можливого залучення ASIC каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів, зокрема у формуванні та підтриманні епілептоформної активності в нейронах гіпокампа. На цій основі формується загальна мета дослідження та ряд конкретних завдань на шляху до її досягнення.

Далі автор пояснює зв'язок роботи з науковими програмами Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, де вона виконувалася, зазначає наукову новизну, теоретичне та практичне значення отриманих результатів, а також надає відомості щодо особистого внеску здобувача, апробації матеріалів дисертаційного дослідження та публікацій по темі дослідження.

В розділі 1 (Огляд літератури) автор аналізує сучасні концепції патогенезу епілепсії, зокрема він висвітлює центральну роль гіпокампа у розвитку цього захворювання. Значна увага приділяється молекулярним механізмам, таким як роль ГАМК рецепторів в механізмах гальмування, а також ролі збуджувальних глутаматних рецепторів у розвитку епілептичних нападів. Ці дані автором систематизовані у вигляді таблиць. Далі автор переходить до розгляду питань щодо ролі зниження рН та його зв'язку з епілептогенезом, зокрема тієї ланки, що опосередкована функцією протон-активованих ASIC каналів різних підтипів. Питання експресії та функції цих каналів в ЦНС посідають центральне місце в огляді літератури. Остання його частина стосується питань участі ASIC

каналів в електрогенезі нейронів, у синаптичній передачі і на цій основі – у розвитку неврологічних захворювань.

Всі ці питання безпосередньо стосуються проблематики даного дослідження, а загалом цей розділ є інформативним, і він повністю відповідає основним напрямкам дослідження.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) деталізуються процедури, що стосуються роботи з експериментальними тваринами, приготування свіжоізольованих зрізів гіпокампа щурів та яким чином відбувалась реєстрація електричної активності гіпокампа в тих чи інших конфігураціях. Найбільш значна увага автором була приділена методам індукції епілептоформної активності нейронів гіпокампа, детально розглянуті дві *in vitro* моделі. Слід також відмітити досить оригінальну модифікацію оптичної ідентифікації окремих нейронів в зрізах гіпокампу.

Розділ 3 (Результати досліджень) складається з 8 підрозділів, в яких наведені основні результати досліджень. У першому з них деталізується пошук оптимальних параметрів для протікання розчинів та їх оксигенації для дослідження епілептоформної активності гіпокампа, що має суто методологічне значення. Далі автор у цілком логічній послідовності переходить від питань формування епілептоформних подій в гіпокампі із застосуванням двох різних *in vitro* моделей до аналізу можливого залучення ASIC каналів до генезу епілептоформної активності у гіпокампі щурів. Найбільш важливими і цікавими є дані останніх двох підрозділів стосовно ролі ASIC у генерації потенціалів дії та спонтанної гальмівної синаптичної активності нейронів гіпокампа.

В розділі 4 отримані результати обговорюються у порівнянні з попередніми дослідженнями цієї проблематики, робляться підсумки. Висновки роботи загалом відповідають поставленим завданням і повністю ґрунтуються на отриманих результатах.

Представлені у дисертаційній роботі результати опубліковані у 10 статтях та тезах конференцій. Відзначу статтю, що була опублікована в журналі «Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences», який відноситься до першого квартилю (Q1). Результати доповідались на фахових наукових симпозіумах, серед яких варто відмітити 8-й з'їзд Українського біофізичного товариства, що відповідає спеціальності 03.00.02 – біофізика.

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

1. Епілепсія є багатофакторним захворюванням, яке може мати різні форми, як спадкові, так і набуті. Яким з цих форм епілепсії найбільш близько відповідають використані у роботі індуковані 4-амінопіридином та розчином з низьким вмістом Mg^{2+} моделі епілепсії?
2. З якою метою були використані дві різні *in vitro* моделі (безмагнієва та 4-АП-індукована) епілептоформної активності? Якими є переваги та недоліки цих двох моделей епілепсії?
3. Яким чином блокування ASIC1a каналів може призводити до збільшення активності ГАМК рецепторів?
4. В розділі «Матеріали та методи дослідження» потрібно було зазначити яким чином вимірювався рівень оксигенації розчинів (модель O_2 -чутливого електрода тощо).
5. В розділі «Матеріали та методи дослідження» зазначається, що «у дослідах використовували блокатори ГАМК, АМПА та НМДА рецепторів», однак результати досліджень містять лише дані, які були отримані з використанням інгібітору NMDA рецепторів D-APV. Які результати були отримані з використанням блокаторів ГАМК і АМПА рецепторів?

6. Статистична обробка результатів дослідження базувалась на використанні двовибіркового парного або непарного t -тестів, тоді як у більшості випадків порівнювались більше, ніж дві групи даних, і отже використання ANOVA було б більш адекватним підходом.
7. В роботі часто згадується «розчин з низьким вмістом Mg^{2+} », тоді як це був повністю безмагнієвий розчин.
8. Є деякі зауваження щодо термінології та визначень:
 - «...спонтанні збуджувальні та гальмівні потенціали у режимі фіксації потенціалу»: очевидно, що у цьому режимі не можна реєструвати зміни мембранного потенціалу;
 - в роботі зустрічаються англіцизми, такі як патерн, файринг нейронів, селлаттач, пулер тощо, а також приклади невдалого перекладу, такі як “активацію внутрішніх струмів”, “блокує внутрішні кальцієві струми” тощо.

Висловлені зауваження 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 Романова Артура Костянтиновича «Роль протон-чутливих іонних каналів у модуляції активності нейронних мереж гіпокампа щурів у нормі та за умов патологічної синхронізації» 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

завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ “Інститут біології та медицини”

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.

