

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Боговика Руслана Ігоревича
«РОЛЬ ПРОТЕАЗАКТИВОВАНИХ РЕЦЕПТОРІВ ПЕРШОГО ТИПУ У РОЗВИТКУ
ЕПІЛЕПТИЧНОГО СТАТУСУ ТА ЙОГО НАСЛІДКІВ У ЩУРІВ», що подана
на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
за спеціальністю 03.00.02 – біофізика

1. Актуальність обраної теми.

Епілепсія – одне з найпоширеніших неврологічних захворювань, частота якого неухильно зростає. Згідно даних Європейської комісії з епілепсії, близько 50 млн. людей у світі страждають на епілепсію, значна частка припадає на дітей, підлітків та людей похилого віку. Клінічними та експериментальними дослідженнями доведено, що у виникненні судомної та епілептиформної активності лежить поєднання багатьох чинників та умов. На сьогодні значна увага приділяється вивченню молекулярних механізмів розвитку епілепсії та ролі нейрозапалення, яке виникає внаслідок порушення гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). При цьому проникнення компонентів крові, насамперед, тромбіну, через порушений ГЕБ активує протеазактивовані рецептори першого типу ПАР-1 та потенціалкеровані натрієві канали і НДМА рецептори, що призводить до підвищення збудливості нейрональних мереж. З другого боку, сама довготривала судомна активність може сприяти порушенню ГЕБ внаслідок підвищення рівня глутамату та активності матричних металопротеїназ ММР 2 і ММР 9. Таким чином, причинно-наслідкові зв'язки епілепсії та ГЕБ є надто важливими у дослідженні патогенезу епілепсії та визначенні молекулярних нейрональних мішеней для фармакотерапії захворювання. Це диктує необхідність поглибленого дослідження впливу протеазактивованих рецепторів першого типу на розвиток і прогресування епілептичних нападів та супутні поведінкові розлади. Тому дисертаційна робота Боговика Руслана Ігоревича «Роль протеазактивованих рецепторів першого типу у розвитку епілептичного статусу та його наслідків у щурів» представляється важливою, сучасною та актуальною.

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

Дисертаційна робота виконана згідно планів наукових досліджень відділу фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної і внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (№ 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (№ 0113U007273).

Нижче, згідно вимог МОН України та на підставі вивчення дисертаційної роботи, автореферату і праць здобувача, опублікованих за темою дисертації, наводжу своє бачення найсуттєвіших науково-теоретичних та практичних аспектів кандидатської дисертації Боговика Руслана Ігоревича.

3. Ступінь обґрунтованості основних положень, висновків та практичних рекомендацій, сформульованих у дисертації.

Сформульовані Боговиком Р. І. основні наукові положення та висновки обґрунтовані достатньою кількістю досліджень, які проведені на 116 лабораторних щурах статевозрілого віку із застосуванням адекватної експериментальної моделі епілепсії та підтверджуються всією сукупністю результатів досліджень, обговорених із залученням зарубіжних джерел.

Перелічене вище дозволяє оцінити одержані результати наукового дослідження, основні наукові положення, висновки як обґрунтовані.

4. Достовірність наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, проведених наукових досліджень та одержаних результатів.

Сформульовані Боговиком Р. І. основні наукові положення та висновки ґрунтуються на використанні адекватних щодо поставлених задач методів нейрофізіологічної та нейроетологічної оцінки функціонального стану мозку. В якості основного нейрофізіологічного методу була використана електроенцефалографія із залученням математичних методів спектрального та середньоквадратичного аналізу потужності біопотенціалів мозку. Методи нейроетологічного тестування дозволяли адекватно оцінити емоційну поведінку щурів та процеси пам'яті. Отримані дані опрацьовані статистично за допомогою одно- чи двофакторного дисперсійного аналізу та непарного t-тесту Стьюдента.

Дослідження проводилися з дотриманням принципів біоетики, що підтверджено протоколом засідання комітету з біомедицинської етики Інституту фізіології імені О. О. Богомольця (№ 2/20 від 26.02.2020 року).

5. Новизна основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій, а також проведених досліджень та одержаних результатів.

Боговиком Р. І. на основі скрупульозного нейрофізіологічного та математичного аналізу біопотенціалів глибоких структур мозку встановлена тригерна роль нюхової цибулини в розвитку епілептиформного нападу за умов експериментальної літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії.

Вперше виявлено вплив селективного блокатора SCH79797 протеазаактивованих рецепторів ПАР-1 на потужність біопотенціалів тета- і гама-діпазону в гіпокампі тварин під час розвитку «транзитної» фази літій-пілокарпінової моделі епілепсії.

Доведено вплив селективного блокатора SCH79797 протеазаактивованих рецепторів ПАР-1 на емоційну реактивність та рівень негативних емоційних реакцій (тривожності) за умови перебігу латентної та «транзитної» фаз літій-пілокарпінової епілепсії.

6. Практичне значення отриманих результатів.

Практичне значення роботи полягає в тому, що розробка прототипу багатоканальної бездротової системи реєстрації біопотенціалів головного мозку щура в умовах вільної поведінки, дозволить проводити синхронні дослідження функціонального стану мозку та поведінкових реакцій в нормі та при розладах функцій ЦНС.

Результати експериментальних нейрофізіологічних і нейроетологічних досліджень щодо позитивних ефектів селективної блокади протеазаактивованих рецепторів ПАР-1 за умов експериментальної літій-пілокарпінової моделі епілепсії будуть сприяти розробці нових фармакологічних підходів щодо терапії епілепсії.

7. Повнота викладу основних наукових положень, висновків та практичних рекомендацій в опублікованих працях та авторефераті.

Дисертант є автором 16 наукових праць за темою дисертаційної роботи, з яких 2 статті надруковані у фахових наукових журналах; 13 тез доповідей на конференціях та з'їздах, в тому числі – міжнародних; має 2 патенти.

Наукові положення та висновки достатньо повно відображені в наукових роботах та авторефераті. Всі розділи автореферату відображають сутність дисертаційної роботи, де в стислій формі викладено результати досліджень, основні положення та висновки. Автореферат дисертації оформлений згідно вимог МОН України.

Матеріали дисертаційної роботи Боговика Р. І. пройшли апробацію на наукових конференціях та з'їздах в Україні та за кордоном.

8. Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота побудована за загально прийнятою схемою згідно вимог МОН України. Роботу викладено на 140 сторінках. Дисертація включає анотацію, список наукових праць, вступ та розділи: огляд літератури, матеріали та методи; результати досліджень, в які входять 6 підрозділів, а також обговорення результатів досліджень, висновки, список використаної літератури (197 джерел).

У «Вступі» переконливо обґрунтовується необхідність проведення даного дослідження, чітко визначено його мету і задачі, виділено наукову новизну і практичне значення роботи, апробація та шляхи впровадження результатів дослідження.

В «Огляді літератури», який складається з 5-ти підрозділів, наведено глибокий системний аналіз літературних джерел відносно факторів та механізмів виникнення та розвитку епілепсії, зроблено акценти на мутаціях генів, які призводять до змін потенціалу мембрани і виникнення дисбалансу процесів збудження-гальмування на мембрані. Значна увага приділена аналізу сучасних уявлень щодо ролі ГЕБ у розвитку епілепсії, значення тромбіну і протеазактивованих рецепторів ПАР-1 у виникненні епілептиформної активності. Узагальнюючи літературні дані, автор дійшов висновку, що антагоністи ПАР-1 та інгібітори тромбіну можуть сприяти пригніченню епілептичних нападів, що потребує проведення подальших експериментальних досліджень.

Розділ «Матеріали і методи» написаний кваліфіковано. Детально описано відтворення літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії та її переваги над пілокарпіновою моделлю. Наведено методи нейроетологічного тестування емоційного стану щурів, стереотаксичного введення електродів у структури мозку, реєстрації електричної активності мозку. Обґрунтовано застосування селективного блокатора рецепторів ПАР-1 та математичних методів аналізу отриманих даних. Використані в роботі методи є адекватними щодо вирішення поставлених автором задач дослідження. Треба зауважити, що літературні дані про патофізіологічні механізми скроневої епілепсії, а також електрофізіологічні характеристики ритмів ЕЕГ, які були представлені в даному розділі, на наш погляд, необхідно було б віднести до розділу «Огляд літератури».

В методичному розділі викладено передумови для розробки системи бездротової реєстрації електричних потенціалів головного мозку, блок-схема основних вузлів телеметричної системи і тестування прототипу на щурах.

Серед найважливіших результатів досліджень, які мають принципове значення для оцінки вкладу дисертанта в розроблювальну проблему та кваліфікаційної характеристики роботи необхідно зазначити наступне.

Автором на основі розробленої чотириканальної бездротової системи реєстрації біопотенціалів мозку та ретельного аналізу сумарної електричної активності нюхової цибулини, гіпокампа та мигдалини із залученням спектрального аналізу густини потужності ритмів показана роль нюхової цибулини в ініціації судомної активності за умов моделювання

літій-пілокарпінової епілепсії у щурів. Отримані факти мають важливе значення не лише для поглибленого розуміння структурно-функціональної організації формування судомного осередку при скроневої епілепсії, але й для диференціації клінічно схожих проявів епілепсій, наприклад, інсулярної (острівкової) та скроневої.

В роботі представлено переконливі докази щодо впливу селективної блокади SCH79797 протеазактивованих рецепторів ПАР-1 на динаміку розвитку епілептогенезу за умови моделювання літій-пілокарпінової моделі скроневої епілепсії у щурів. Слід зазначити, що автором добре продуманий дизайн досліджень. Він включав дослідження впливу селективної блокади SCH79797 протеазактивованих рецепторів ПАР-1 при введенні щурам окремо LiCl, окремо пілокарпіну, а також їх поєднання. Спостереження проводили з урахуванням фаз розвитку епілепсії – латентної, транзитної та становлення епілептичного статусу. Це дозволило дисертанту виявити вплив блокатора рецептора ПАР-1 на потужність ритмів тета- і гама-діапазону частот електричної активності гіпокампу та зменшення гіперсинхронізованості нейронних мереж виключно під час транзитної фази перебігу літій-пілокарпінової епілепсії. На підставі отриманих даних Боговиком Р. І. зроблено припущення, що зміни електричної активності в гіпокампі тварин під впливом селективного блокатора SCH79797 протеазактивованих рецепторів ПАР-1 викликані пригніченням тромбін/ПАР1-залежних механізмів та їх здатності до модуляції електричної активності гіпокампу.

У зв'язку з тим, що емоційні розлади та когнітивна дисфункція є найбільш розповсюдженими психічними розладами при епілепсії, а також те, що їх прояви залежать від фази розвитку епілептогенезу, вкрай важливими є дані, представлені Боговиком Р. І. в нейроетологічному розділі дисертаційної роботи. Слід зазначити, що дисертант приділив увагу експериментальним дослідженням тривожності та пам'яті, пов'язаних з емоційно-негативними подіями, розлади яких притаманні хворим на скроневу епілепсію. В роботі отримано переконливі докази про те, що селективна блокада протеазактивованих рецепторів ПАР-1 підтримує на рівні інтактних тварин тривожність та емоційно зумовлену пам'ять за умов розвитку латентної фази літій-пілокарпінової епілепсії. Системне введення (протягом 10 експериментальних днів) селективного блокатора ПАР-1 щурам у хронічну фазу розвитку епілептогенезу призводило до пригнічення судомної готовності мозку та покращення емоційного стану щурів. Виявлено зменшення майже на 54 % поведінкових проявів судомної активності за шкалою Расіна та зниження рівня тривожності та емоційно зумов-

леної пам'яті. Автор трактує отримані позитивні ефекти як прояв нейропротекторної дії селективної блокади рецепторів ПАР-1 гіпокампу. На наш погляд, отримані факти є перспективними для розробки нових фармакологічних підходів щодо лікування епілепсії.

У розділі «Обговорення результатів дослідження» дисертант на високому професійному рівні аналізує результати досліджень та розглядає їх з позицій підвищення збудливості нейрональних мереж внаслідок активації протеазактивованих рецепторів першого типу та корегуючих впливів селективного блокатора SCH79797, порівнює з даними літератури, формулює основні положення, які відображені у 5 висновках і дають відповіді на поставлені в роботі питання.

Таким чином, у дисертаційній роботі Боговика Р. І. з використанням розробленої багатоканальної бездротової системи реєстрації біопотенціалів структур мозку, комплексу сучасних нейрофізіологічних, нейроетологічних і математичних методів дослідження діяльності мозку розкрита роль протеазактивованих рецепторів першого типу в механізмах епілептогенезу та його пригніченні.

9. Запитання, зауваження та рекомендації з боку опонента.

Принципових зауважень до дисертації та автореферату немає.

Запитання до дисертаційної роботи носять дискусійний характер, але не впливають на її загальну позитивну оцінку.

1) Як відомо, однією з функцій гама-ритму є обробка сенсорної інформації. Чи можна розглядати зміни активності гама-ритму в якості ЕЕГ-корелятив проявів сенсорної аури за умов епілепсії?

2) Під час проведення нейроетологічних досліджень в тестах «відкрите поле» і «хрестоподібний лабіринт» у щурів з моделлю літій-пілокарпінової епілепсії та за умови блокування ПАР-1 чи виявлено Вами зміни у проявах орієнтовно-дослідницької активності щурів як однієї з простих форм когнітивної діяльності?

3) У Вашій роботі виявлено вплив ПАР-1 на кількість спонтанних судомних нападів при експериментальній епілепсії у щурів, а чи змінювалася за цих умов тривалість самого нападу, трансформація великих нападів у малі?

4) З урахуванням отриманих в роботі даних про залучення нюхової цибулини в ініціацію та розвиток епілептичних нападів, варто було б провести дослідження щодо впливу

фармакологічної блокади ПАР-1 на електрофізіологічні прояви судомної активності в нюховій цибулці.

Висновок.

Дисертаційна робота Р. І. Боговика «Роль протеазактивованих рецепторів першого типу у розвитку епілептичного статусу та його наслідків у щурів» є фундаментальним дослідженням, в якому вивчено роль протеазактивованих рецепторів першого типу у змінах біопотенціалів структур мозку, емоційних реакцій та пам'яті за умов пілокарпінової моделі епілепсії у щурів, що вносить вагомий вклад у проблему вивчення механізмів регуляції збудливості мозку і має важливе значення для епілептології. Дисертація Р. І. Боговика за актуальністю проблеми, методичними підходами, науковою новизною та практичною цінністю отриманих результатів являється завершеною науковою працею, яка відповідає вимогам п. 9, 11, 12, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою КМУ № 567 від 24.07.2013 р. (зі змінами, внесеними згідно Постанови КМУ № 656 від 19.08.2015 р., № 1159 від 30.12.2015 р. та № 567 від 27.07.2016 р.) щодо оформлення результатів та їх аргументованої оцінки, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика.

Офіційний опонент:

Зав. лабораторією нейрофізіології, імунології та біохімії ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», д-р біол. наук, проф.



Берченко О. Г.