

## **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**

**ФЕДОРЮКА МИХАЙЛА 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**

З часу відкриття протон-чутливих іонних каналів (Acid-sensing ion channels - ASICs) в лабораторії акад. Кришталя О.А. в 1980-х роках інтерес дослідників до цієї суперродини іонних каналів продовжує постійно зростати. Це пов'язано як зі складністю будови і регуляції цих канал-формуєчих білків, їхніми неординарними біофізичними та фармакологічними властивостями, що ставить низку питань теоретичного характеру загальнобіологічного значення з однієї сторони, так і наявністю ASIC каналів в різних типах клітинах, від нейронів ЦНС і до гладеньком'язових клітин судин, і навіть в кістковій і жировій тканинах. Паралельно розгортаються дослідження і тривають дискусії щодо фізіологічної та патофізіологічної ролі цих досить унікальних іонних каналів.

Епілепсія зараз все більше розглядається як багатофакторна, складна патологія ЦНС, що може мати багато різних форм, від вроджених до набутих. В контексті даного дослідження зазначу також, що епілепсія відноситься до захворювань, для лікування яких важливе значення мають саме фармакологічні модулятори тих чи інших іонних каналів (так звані каналопатії). Базуючись на цьому, очевидно, що пошук нових модуляторів активності іонних каналів є перспективним для лікування цього захворювання, адже бажано мати ще більш ефективні і селективні препарати.

Таким чином, дисертаційне дослідження Федорюка М.П., метою якого було визначення ролі ASIC каналів в регуляції електричної активності гіпокампа та поведінці щурів при епілепсії, відповідає найбільш сучасним науковим трендам у цій галузі. Воно є актуальним і важливим як з теоретичної, так і з практичної точки зору.

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

Автором дисертаційного дослідження було отримано цілий ряд нових даних, або таких, що суттєво доповнюють існуючі уявлення щодо можливого залучення ASIC каналів в генерації електричної активності гіпокампа та поведінкових реакціях, зокрема при епілепсії.

На особливу увагу заслуговують нові дані щодо фізіологічних реакцій у відповідь на введення піддослідним тваринам блокатора ASIC каналів – сполуки 5b. Цей селективний, високоафінний неконкурентний антагоніст ASIC1a ізоформи був розроблений в лабораторії акад. Кришталя О.А. в 2015 р. Цілком слушно, що саме в цій лабораторії зараз ведуться широкі *in vivo* дослідження у напрямку з'ясування функціональної ролі ASIC1a підтипу як в нормі, так і при різних патологічних станах. Дисертаційне дослідження Федорюка М.П.



поширює цю проблематику на такі питання, як електрична активність гіпокампа та поведінкові реакції щурів за умов експериментальної епілепсії. Це логічний наступний крок як для характеристики цілого спектру неврологічних розладів при епілепсії (теоретичне значення), так і у напрямку розробки нових лікарських препаратів для корекції таких патологічних станів (практичне значення).

При цьому слід зазначити, що дане дисертаційне дослідження носить переважно фундаментальний характер і не містить конкретних рекомендацій щодо практичного застосування отриманих результатів. Тим не менш, отримані результати досить переконливо свідчать про перспективність використання антагоністів ASIC каналів, зокрема ASIC1a підтипу, для фармакологічної корекції поведінкових розладів, які супроводжують розвиток епілепсії.

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

Наукові положення дисертаційної роботи базуються на застосуванні комплексу методів, що включали як прямі електрофізіологічні реєстрації електричної активності гіпокампа за допомогою оригінального пристрою на основі імплантованих у мозок тварини електродів, так і різних поведінкових тестів, які є загальноприйнятими і широко використовуються у фізіологічних дослідженнях. Це дозволило автору досить повно охарактеризувати поведінковий статус дослідних тварин в контролі та за умов експериментальної епілепсії у порівнянні з контрольними тваринами.

Загалом проведені дослідження відповідають сучасним трендам у галузі біомедичних наук, оскільки зараз значна увага приділяється визначенню патофізіологічної ролі тих чи інших іонних каналів як найбільшого класу молекулярних мішеней для лікування різних

захворювань саме за умов *in vivo*. Важливо відмітити і те, що автор використав дві різні моделі експериментальної епілепсії, як літій-пілокарпінову, так і каїнатну, що дозволило сформулювати більш обґрунтовані гіпотези щодо можливості фармакологічної корекції епілептичних станів та поведінкових розладів, як їх супроводжують, шляхом пригнічення активності ASIC1a каналів.

В той же час це дослідження ставить і важливе питання щодо можливих молекулярних та біофізичних механізмів посилення активності цих каналів під час епілептичних нападів, відповідь на яке очевидно потребує подальших досліджень.

Експериментальні процедури та підходи до статистичного аналізу є достатньо деталізованими. Висновки по кожній серії проведених експериментів базуються на достатній кількості вимірів та їх адекватному статистичному аналізу і обговоренні.

Загалом Федорюк М.П. показав себе компетентним науковцем, який добре обізнаний з науковою літературою по досліджуваній проблемі, засвоїв технічно складні електрофізіологічні методи дослідження і брав участь у розробці оригінального пристрою для дистанційної реєстрації електричної активності мозку з використанням імплантованих у мозок електродів. Вважаю, що Федорюк М.П. також продемонстрував свою здатність до фахового та критичного аналізу отриманих результатів у контексті інших досліджень цієї проблематики.

### **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 двох наукових тем, у тому числі проекту науково-дослідних робіт для молодих вчених «Механізми розвитку епілептиформної активності та властивості



синаптичної пластичності гіпокампа в умовах порушення цілісності гематоенцефалічного бар'єру».

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

Дисертаційна робота Федорюка М.П. побудована за загальноприйнятою формою у відповідності до вимог МОН України. Роботу викладено на 125 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 отриманих результатів, висновки та список цитованої літератури (121 джерело). Методи досліджень та отримані результати проілюстровані 29 рисунками, які дають повне уявлення про об'єм та якість проведених досліджень.

У вступі наведені дані щодо експресії, біофізичних властивостей та функцій ASIC каналів. На основі відомих фактів щодо зниження рН у міжклітинному середовищі під час епілептичних нападів автором пропонується цілком слушна гіпотеза щодо можливого залучення ASIC каналів до генерації та підтримки епілептичних нападів. Відповідно до цієї гіпотези блокування ASIC каналів мало б полегшити або навіть припинити епілептичні напади. На цій основі формується основна мета дослідження – «оцінити роль протон-чутливих іонних каналів в регуляції електричної активності гіпокампа і поведінці щурів у експериментальній моделі індукованої епілепсії».

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 висвітлює такі питання, як історія відкриття та філогенетичні стосунки протон-активованих ASIC каналів, а це важливо в контексті використаної ним тваринної моделі експериментальної епілепсії. Далі автор на основі літературних даних аналізує структурно-функціональні аспекти цих каналів, їх регуляцію та біофізичні властивості. Окремо відмічу розділ, що присвячений аналізу фармакологічних властивостей ASIC каналів, як один з найбільш ґрунтовних, а також важливих для проблематика даного дослідження.

Загалом цей розділ повністю відповідає основним напрямкам дослідження.

В розділі 2 (Матеріали і методи дослідження) деталізується яким чином відбувалась реєстрація електричної активності гіпокампа у імобілізованих щурів та у щурів під час проведення поведінкових тестів – в останньому випадку автор використав оригінальний бездротовий пристрій. Також деталізована індукція епілепсії у щурів з використанням каінатної та літій-пілокарпінової моделей експериментальної епілепсії. Слід окремо відмітити, що цей розділ добре проілюстровано 9 рисунками.

Розділ 3 (Результати досліджень) складається з трьох підрозділів, в яких наведені основні результати досліджень. У першому з них проаналізоване можливе залучення ASIC каналів до генезу епілептиформної активності у гіпокампі щурів. У другому та третьому підрозділах наведені дані щодо ролі ASIC каналів в електричній активності гіпокампа щурів у поведінковій моделі «відкрите поле», а також в декількох поведінкових тестах (відкрите поле, піднятий хрестоподібний лабіринт) та в формуванні пам'яті, що зумовлена страхом, у щурів з індукованою епілепсією.



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 9 статтях та тезах конференцій, автор також отримав 1 патент. 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 симпозиумах, серед яких варто відмітити з'їзди Українського біофізичного товариства, що відповідає спеціальності 03.00.02 – біофізика.

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

1. Відомо, що патогенез такого багатофакторного захворювання як епілепсія є надзвичайно складним, вона має цілий спектр форм - від спадкових до набутих. До яких з цих форм епілепсії є найближчими використані у роботі каїнатна та літій-пілокарпінова експериментальні моделі епілепсії?
2. Анотація дисертаційної роботи містить досить багато звернень до літературних даних, що утруднює чітке розмежування між тим, що саме було показано у даному дослідженні і тим, що було відомо раніше.
3. Потрібно уточнити об'єм розчину, який містив сполуку 5b і який вводився в мозок щура. В роботі зазначено 4 мл, чи не занадто великим він є для внутрішньогіпокампальної ін'єкції речовини? Також виникає питання як можна оцінити діючу концентрацію блокатора ASIC1a каналів і чи вона співставна з тими даними, які

були раніше отримані для сполуки 5b в експериментах *in vitro* (на ізольованих нейронах тощо)?

4. Потрібно уточнити величину частоти епілептиформних розрядів у гіпокампі щурів в каїнатній моделі епілепсії, адже в тексті зазначено діапазон 20-80 Гц (розділ 3.1), тоді як на рисунку 3.3 наведено середнє значення в межах 5-6 Гц.
5. Яким чином вимірювалася сумарна потужність тета-діапазону гіпокампу щурів? Як реєструвалася тривалість завмирання щурів в тесті на пам'ять, що зумовлена страхом, і зокрема яка роздільна здатність цього методу (з врахуванням того, що мінімальне значення цього часу становило 0,2 с)?
6. Зауваження щодо термінології та визначень:
  - в роботі трапляються терміни як «припадки», так і «напади» правильно було б вживати термін «напади»;
  - «референсний та заземлюючий електроди» - це не зовсім точна термінологія (особливо «заземлюючий»). Також варто пояснити необхідність використання двох електродів в такій якості для нульового потенціалу;
  - «рецептор експресується дуже щільно» - це не зовсім точне визначення, адже термін «експресія» стосується гену, що кодує рецептор;
  - «перехідні струми ASIC» очевидно мова тут іде про транз'єнтний (або інактивуючийся) компонент стимулу;
  - «зі значеннями  $IC_{50}$  до декількох мілімолярів».

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 Федорюка Михайла 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

завідувач кафедри біофізики та медичної інформатики

ННЦ "Інститут біології та медицини"

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка,

доктор біологічних наук, професор Жолос О.В.

*Жолос О.В. Голова кафедри*  
*Заст. директора* *Крижанець Т.А.*

