

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

Запухляк Ольги Сергіївни

***«ЕПІЛЕПТИФОРМНА АКТИВНІСТЬ ГІПОКАМПА ЩУРІВ ЗА УМОВ
ПОВНОЇ АБО ЧАСТКОВОЇ БЛОКАДИ СИНАПТИЧНОЇ ПЕРЕДАЧІ»***

**представлену на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за
спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин**

Актуальність проведених досліджень

Дисертаційна робота Запухляк Ольги Сергіївни присвячена дослідженню механізмів розвитку синхронізації активності нейронних мереж гіпокампа СА3–СА1, що має значення для кращого розуміння складної проблематики формування епілептоформної активності гіпокампа. Гіпокамп – це та структура головного мозку, яка відома високою схильністю до патологічної синхронізації та є генератором судомної активності в більшості випадків фокальних епілепсій. Навіть за умов блокування синаптичної передачі нейронні мережі гіпокампа здатні генерувати та підтримувати характерну «несинаптичну» епілептиформну активність. З'ясування механізмів та факторів що сприяють патологічній синхронізації активності нейронних мереж гіпокампу за умов блокади синаптичної передачі дозволить покращити сучасні методи контролю та запобігання судомних станів.

Метою дисертаційної роботи Запухляк О.С. було саме з'ясування характеристик та механізмів виникнення спонтанної епілептиформної активності в

свіжоізолюваних зрізах гіпокампа щурів за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі.

Ця тема є безперечно важливою і актуальною зважаючи на значну роль гіпокампа у розвитку судомних нападів, а також недостатню ефективність сучасних протиепілептичних засобів.

Наукова новизна отриманих результатів, їх практичне та теоретичне значення

В дисертаційній роботі вперше показано, що під час часткового блокування синаптичної передачі шляхом суперфузії зрізів мозку щурів розчином штучної спинномозкової рідини, котра містила суміш антагоністів глутаматних АМПА- та НМДА-рецепторів та ГАМК-рецепторів, в гіпокампі виникає характерна епілептиформна активність – польові розряди. Під час повного блокування синаптичних процесів в гіпокампі як шляхом перфузії зрізів низькокальцієвим розчином, так і шляхом блокади потенціалкерованих кальцієвих каналів кадмієм хлоридом польові розряди не виникають, а переважним проявом синхронізації активності нейронів за таких умов є виникнення популяційних спайків.

В роботі вперше показано, що рівень синхронізації активності нейронів гіпокампа в зонах CA3–CA1 під час часткової блокади синаптичної передачі є значно вищим, ніж за умов її повної блокади. Таким чином, отримані результати свідчать про наявність додаткового механізму синхронізації нейронних мереж гіпокампа, який не залежить від стану збуджувальної глутаматергічної та гальмівної ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Це спостереження представляє певний теоретичний інтерес, оскільки відомо, що глутамат- та ГАМКергічні рецептори забезпечують переважну більшість синаптичних контактів між зонами гіпокампа CA3–CA1.

В дисертаційній роботі вперше досліджено роль нікотинових ацетилхолінових рецепторів у синхронізації активності нейронів CA3–CA1 зон гіпокампа за умов

часткового блокування синаптичної передачі. Показано, що неселективні антагоністи nACh рецепторів (мекаміламін та тубокурарин) припиняють CA3–CA1 синхронізацію епілептиформної активності, що виникала у розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами (тобто під час часткового блокування синаптичної передачі). Натомість аплікація селективних антагоністів $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -вмісних підтипів nACh рецепторів не мала впливу на генерацію епілептиформної активності за таких умов.

Таким чином в роботі вперше показано, що nACh рецептори (але не $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -підтипи) беруть участь в CA3–CA1-синхронізації активності нейронів гіпокампа, і що цей процес не залежить від стану глутамат- та ГАМК_A-ергічної синаптичної передачі. Також в дисертаційній роботі було досліджено вплив наведених вище антагоністів нікотинових холіноцепторів на інтенсивність епілептиформної активності, яку було індуковано шляхом суперфузії зрізів розчинами з антагоністом ГАМК_A рецепторів бікукуліном, антагоністом калієвих каналів 4-амінопіридином та розчином з низьким вмістом магнію. Вперше показано, що мекаміламін пригнічує епілептиформну активність, яка була індукована антагоністом ГАМК_A рецепторів бікукуліном. Таким чином одержані результати вперше свідчать про істотну роль nACh рецепторів в розвитку бікукулін-індукованої гіперсинхронізації в гіпокампі.

Результати дисертаційної роботи мають теоретичне та практичне значення. Зокрема, в роботі доведена роль nACh рецепторів в синхронізації нейронних мереж CA3–CA1 гіпокампа незалежно від стану глутамат- та ГАМК_A-ергічної синаптичних систем. Цей факт вказує на потенційну роль nACh рецепторів як можливої фармакологічної мішені при розробці протиепілептичних засобів. Показано, що антагоніст nACh рецепторів мекаміламін (антигіпертензивний препарат) припиняє синхронізацію епілептиформної активності в межах CA3 та CA1 в свіжоізольованих зрізах гіпокампа. Цей факт дає підстави для подальшого вивчення можливих протиепілептичних властивостей мекаміламіну.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Сформульовані в дисертаційній роботі висновки ґрунтуються на застосування адекватних поставленим задачам методів. Реєстрація епілептиформної активності проводилась в свіжоізолюваних зрізах мозку щурів, індукція спонтанної епілептиформної активності досягалась шляхом суперфузії зрізів гіпокампа щурів розчином штучної спинномозкової рідини. Позаклітинні польові потенціали відводили двома електродами одночасно в ділянках CA3 та CA1 гіпокампа. Аналіз вибірок включав визначення середнього та стандартного відхилення (середнє квадратичне). Для перевірки гіпотези щодо відповідності розподілу емпіричних даних нормальному закону було застосовано критерій Шاپіро-Уїлка. Для визначення статистичної вірогідності міжгрупових різниць було застосовано парний та непарний *t*-тест Ст'юдента, дисперсійний аналіз ANOVA, а також тест Колмогорова-Смирнова та парний тест Уїлкоксона. Рівень синхронізації епілептиформної активності, що виникала одночасно в CA1 та CA3, оцінювали за допомогою крос-кореляційного аналізу. Висновки дисертаційної роботи базуються на достатній кількості вимірів та їх адекватному статистичному аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами планами темами

Роботу виконано відповідно загальному плану наукових досліджень у відділі фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012 – 2016; номер державної реєстрації – 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273), «Молекулярно-генетичні та

фармакологічні засоби впливу на клітинні механізми неврологічних розладів» (№ державної реєстрації 0118U007343

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

Дисертаційна робота Запихляк О.С. представлена за загальноприйнятою формою та відповідає вимогам МОН. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень та обговорення, а також висновків та списку використаних джерел (207 найменувань). Робота викладена на 141 сторінках, проілюстрована 63 рисунками та містить 2 таблиці.

Розділ 1 «Огляд літературних даних» складається з 5 підрозділів, в яких наведено сучасні дані щодо класифікації епілепсій, етіології та патогенезу судомних станів; надано морфо-функціональну характеристику гіпокампа, наведені літературні дані щодо основних медіаторних систем в гіпокампі та участі nACh рецепторів в модуляції активності цієї структури головного мозку. Також надано огляд сучасних методів експериментального дослідження епілепсії *in vitro*, висвітлені відомості стосовно ролі гіпокампа в генерації церебральної судомної активності та розглянуто основні механізми генерації епілептиформної активності в умовах блокади синаптичної передачі.

Розділ 2 «Матеріали та методи дослідження» містить 6 підрозділів, в яких обґрунтовано вибір об'єкту дослідження – свіжоізольованих зрізів гіпокампа щурів – як адекватної дослідницької моделі, розглянуто методи індукції спонтанної епілептиформної активності в свіжоізольованих зрізах мозку щурів, описано методи реєстрації такої активності в зонах гіпокампа CA3 та CA1. Цей розділ містить детальний опис отримання свіжоізольованих зрізів мозку щурів, приготування розчинів штучної спинномозкової рідини та модифікації хімічного складу цього розчину з метою виклику епілептиформної активності в зрізах

гіпокампа. Наведені приклади різних видів епілептиформної активності в гіпокампі та методи її індукції, а також детально описані методи статистичної обробки отриманих результатів.

Розділ 3 «Результати досліджень» містить 8 підрозділів, в яких наведені отримані результати в їх логічній послідовності. В розділі наведено характеристики епілептиформної активності, індукованої в гіпокампі під час повного або часткового блокування синаптичної передачі, порівняно її основні параметри, виявлено істотні відмінності. Цей розділ також містить дані щодо рівня синхронізації епілептиформної активності в зонах CA3 та CA1 гіпокампа під час блокування синаптичної передачі. Показано роль зони CA3 в генерації та розповсюдженні епілептиформної активності, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами, наведено результати стосовно впливу антагоністів nACh рецепторів на інтенсивність епілептиформної активності за умов часткового блокування синаптичної передачі та за умов *in vitro*-моделей епілепсії.

Розділ 4 «Обговорення результатів» складається з 3 підрозділів, в яких наведено аналіз отриманих результатів щодо характеристик епілептиформної активності в зонах гіпокампа CA3 та CA1 за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі. Проаналізовано вплив антагоністів nACh рецепторів та роль цих рецепторів у розвитку CA3-CA1-синхронізації епілептиформної активності у гіпокампі.

Представлені у дисертаційній роботі результати були опубліковані у 6 статтях у фахових наукових журналах та 3 тезах доповідей у збірках матеріалів наукових конференцій та з'їздів. Серед них особливо варто відмітити публікацію у рейтинговому журналі Plos One, а також доповіді на фахових конференціях в Україні (VI Міжнародний конгрес Українського товариства нейронаук) та Великобританії (The Physiological Society), які відповідають спеціальності 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

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

1. Хоча атропін класично є насамперед конкурентним антагоністом мускаринових холіноцепторів, тим не менш в літературі є дані щодо можливого концентраційно-залежного інгібування або навіть активації атропіном також і нікотинових ацетилхолінових рецепторів, зокрема тих підтипів, що мають субодиничну будову: $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 7$, серед яких $\alpha 4\beta 4$ є найбільш чутливою до дії атропіну комбінацією субодиниць nAChR. Чи не могли такі ефекти вплинути на інтерпретацію отриманих з використанням атропіну даних?

2. «Аплікація атропіну мала вплив досить обмежений статистично невірогідний...», в іншому місці «...дещо зменшувала ступінь CA3–CA1-синхронізації ЕФА, але ефект не досягав рівня достовірності» - це означає відсутність впливу.

3. Двовалентні катіони мають значний вплив на поверхневий потенціал мембрани як наслідок екранування фіксованих негативних зарядів на мембрані клітини. Тому просте видалення іонів кальцію з розчину може мати неспецифічний вплив на інші потенціалзалежні провідності, і кращим варіантом була б еквімолярна заміна кальцію на магній з метою збереження так званого стабілізуючого впливу двовалентних катіонів на мембрану клітини.

4. Чи можна сформулювати на основі проведених досліджень певні практичні поради щодо застосування фармакологічних модуляторів nACh рецепторів для профілактики епілептичних нападів – окремо або ж в комбінації з агоністами чи антагоністами інших типів рецепторів?

5. Деякі зауваження щодо термінології:

- «суміш синаптичних антагоністів» - це зрозуміла, але невдала термінологія;
- у роботі при обговоренні ГАМК рецепторів і ГАМК-ергічної передачі лише винятково згадується, що мова іде про іонотропні ГАМК_A рецептори. Оскільки є

і інший клас ГАМК рецепторів – спряжені з G-білками ГАМК_В рецептори, то варто було б постійно використовувати аббревіатуру ГАМК_А.

Висловлені зауваження суттєво не впливають на мою загалом дуже 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 Запущляк Ольги Сергіївни на тему *«Епілептиформна активність гіпокампа щурів за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі»* відповідає всім вимогам до дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата наук, а її авторка заслуговує присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

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.



Підпис О.В. Жолоса засвідчую

Заступник директора ННЦ "Інститут біології та медицини"

з наукової роботи,

д.б.н.



Сокур Л.В.