

## ВІДЗИВ

офіційного опонента на дисертаційну роботу *Ісаєвої Олени*

*Валентинівни* «Вплив епілептиформної активності на функціонування головного мозку щурів», подану в спеціалізовану вчену раду Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин

**Актуальність обраної теми.** Життєвий досвід та клінічні спостереження різноманітних порушень в діяльності мозку з гіркотою і досить часто з безнадією констатують лише той факт, що більшість цих порушень «виросли» десь в дитинстві. Натепер приходить розуміння того, що одним із критичних періодів, які визначають подальше нормальне функціонування мозку є ранній постнатальний період, коли мозок найактивніше росте і змінюється. Якщо в цей період відбуваються певні екстраординарні події, зокрема такі як судомні або епілептичні напади, то наслідком цього можуть бути системні порушення в діяльності мозку, що в подальшому може призвести до розвитку такого грізного захворювання як епілепсія, змін вищих психічних функцій і соціальної дезадаптації. Хоча в сучасній нейрофізіології розроблено цілий ряд експериментальних моделей епілепсії, що дозволяють глибше зрозуміти молекулярні і нейронні механізми формування набутої епілепсії і попри розуміння загальних причин і проявів цього захворювання, загальної стратегії запобігання розвитку цього захворювання немає. Причин цьому багато, але найголовнішою із них є та, що епілепсія - це системне захворювання всього мозку, яке зачіпає і змінює тонкий баланс основних процесів нашого мозку – збудження і гальмування в різних ділянках мозку за різними механізмами, які пов'язані як з функціональними, так і структурними змінами. Дисертаційна робота *Ісаєвої Олени Валентинівни*, яка є системним експериментальним

дослідженням цього надважливого питання є вкрай актуальною, бо в даній роботі вперше зроблено спробу вивчити на нейронному і системному рівні механізми змін функціонування різних ділянок мозку за різних форм експериментальної епілепсії та з'ясувати вплив формування спонтанної епілептиформної активності в неонатальному періоді на нейронні механізми функціонування ключових ділянок мозку в подальшому, що може проявлятися у відповідних змінах поведінки.

Результати досліджень дисертаційної роботи, з одного боку, можуть бути основою для розробки і проведення попереджувальних заходів змін функціонування мозку після появи і діагностування наявності в мозковій епілептиформної активності, перенесених епілептичних нападів в ранній період онтогенезу, епілептичного статусу тощо, а з другого, можуть бути основою для розробки принципово нових засобів для лікування і попередження судомної активності та її наслідків, коли традиційна терапія є неефективною.

Виходячи з всього викладеного вище, вважаю, що рецензована робота є актуальною, як з точки зору вирішуваних в ній фундаментальних питань, так і практичного застосування її результатів.

**Новизна дослідження і отриманих результатів.** Автором встановлено принципово нові факти, важливі для розвитку сучасних уявлень про нейрофізіологічні механізми впливу різних форм епілептиформної активності в ранньому онтогенезі на пластичні зміни збуджувальної та гальмівної синаптичної передачі в різних відділах мозку і зміну поведінки у віддалені після розвитку судомної активності строки. Вкрай важливим є те, що в роботі крім класичних експериментальних моделей та класичних підходів до пояснення причин появи в мозковій пароксизмальної активності автором розглянуто участь тромбіну в розвитку катастрофічних наслідків епілептичного статусу, який порушує гематенцефалічний бар'єр та збільшує його проникність. Зокрема в



роботі вперше показано, що повторювані судомні напади в ранньому постнатальному періоді, викликані інгаляцією флуротилу, суттєво знижують амплітуду гальмівних постсинаптичних струмів у пірамідних нейронах зони СА3 гіпокампа щурів і не впливають на параметри збуджувальних постсинаптичних струмів у цих нейронах. Встановлено, що подібні неонатальні судомні напади суттєво знижують пороги виникнення епілептиформної активності в соматосенсорній корі щурів, знижуючи амплітуду спонтанних ГПСС і частоту відповідних мініатюрних струмів в пірамідних нейронах 2/3 шарів кори та збільшуючи амплітуду і частоту спонтанних збуджуючих постсинаптичних струмів. Підкреслено, що зростання частоти мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів в цих нейронах має пресинаптичну природу. Доведено важливу роль НМДА-рецепторів в порушенні функції збуджувальної синаптичної передачі в нейронах соматосенсорної кори щурів, які мали неонатальні судомні напади. Встановлено також, що неонатальні судомні напади зумовлюють хронічні зміни гальмівної синаптичної передачі в пірамідних нейронах шару 5 медіальної зони пре фронтальної кори та призводять до хронічного підвищення посттетаничної потенціації синаптичної передачі між шарами 2/3 і 5 та в межах шару 5 цієї зони кори. Автором розроблена модель повторюваної епілептиформної активності через внутрішньо мозкове введення бікукуліну. Застосування цієї моделі на щурах в ранній постнатальний період дозволило виявити, що локальна повторювана ін'єкція бікукуліну в медіальну пре фронтальну кору зумовлює значний дефіцит уваги і розлади соціальної поведінки піддослідних тварин. Вперше показано, що епілептичний статус, спровокований ін'єкціями пілокарпіну, спричиняє високу смертність і захворюваність піддослідних тварин, підвищує рівень тромбіну, знижує експресію протеазаактивованих рецепторів 1 і загибель нейронів в зоні СА1 гіпокампа. На основі отриманих даних зроблено принципово важливий висновок про те, що саме система тромбін – протеазаактивовані рецептори 1

може бути однією із ключових ланок епілептогенезу за умов формування епілептичного статусу. Доказом цього є дані автора про те, що пригнічення активності протеазаактивованих рецепторів 1 виявляє нейропротекторний і антиепілептогенний ефекти, що може стати основою нової "антиепілептогенної" терапії.

**Теоретичне і практичне значення результатів дослідження.** Дані дослідження дозволяють розширити фундаментальні уявлення про вплив і наслідки різних форм епілептичної активності на базові механізми функціонування ключових підкоркових і коркових структур мозку та дають можливість оцінити наслідки появи епілептиформної активності в ранньому віці на когнітивні функції та соціальну поведінку. Результати досліджень автора свідчать не тільки про теоретичну новизну роботи, а і про органічне поєднання цих фундаментальних розробок з перспективою їх подальшого використання в практиці. Вони можуть служити об'єктивним підґрунтям для розробки нових методичних підходів до боротьби з наслідками різних форм епілепсії. Отримані в роботі дані можуть стати основою розробки нових клінічних засобів та технологій в боротьбі тими формами епілепсії, які не піддаються лікуванню традиційними засобами.

Отримані в даній роботі відомості про системні механізми функціонування мозку з наявною готовністю до пароксизмальної активності чи проявами епілепсії заслуговують на використання при читанні загальних та спеціальних курсів для студентів кафедр нормальної і патологічної фізіології медичних університетів та кафедр фізіології людини і тварин класичних університетів.

**Ступінь обґрунтованості і достовірність наукових положень і висновків, які сформульовані в дисертації.**



Результати рецензованої роботи отримані при використанні експериментальних різних моделей епілепсії та епілептиформної активності різного генезу. Крім того автором розроблено оригінальну модель формування локальних вогнищ епілептиформної активності в корі переднього мозку щурів.

В роботі зроблено глибинний аналіз пароксизмальної активності та її наслідків із застосуванням електрофізіологічних (петч-клемп-реєстрація постсинаптичних струмів, мікроелектродна реєстрація мембранного потенціалу), цитологічних (оцінка життєздатності та загибелі клітин, визначення рівня тромбіну і протеазаактивованих рецепторів<sup>1</sup>) і поведінкових методик (відкрите поле, соціальна взаємодія, поведінкова гнучкість як показник стану оперативної пам'яті), що робить цю роботу справді системною і дозволило авторів дійти до інтегральних узагальнень та висновків, не відступаючи від принципів строгої наукової логіки. Загалом можна констатувати, що робота виконана на найвищому методичному рівні з використанням найсучасніших методів досліджень.

Конкретні завдання роботи логічно вписуються в загальну мету, а використані методи цілком адекватні вирішуваним завданням.

Усі проведені дослідження містять у собі необхідний і валідний контроль, що не залишає сумніву у високій достовірності отриманих результатів. Висновки дисертанта базуються на великому експериментальному матеріалі. Достовірність висновків підтверджується аргументованим аналізом результатів та статистичними методами і не викликає жодних сумнівів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася в рамках семи науково-дослідних робіт, які проводились відповідно до наукових програм відділів загальної фізіології нервової системи і фізико-хімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (197U0009158, 0100U002062,

0107U005336, 0107U010843, 0110U004750), в рамках проекту Українського науково-технологічного центру (№ 102/58), а також на базі державної ключової лабораторії молекулярної та клітинної біології (UF45.2/001).

**Повнота викладення наукових положень, висновків та рекомендацій в опублікованих працях.**

Основні положення дисертації опубліковані у 36 наукових працях, з них 22 статті у фахових виданнях (6 – у наукових періодичних виданнях України і 16 – у провідних зарубіжних журналах з високим рейтингом та високим імпакт фактором), та 14 тез доповідей у матеріалах міжнародних та вітчизняних наукових з'їздів і конференцій. Обсяг друкованих робіт та їх кількість повністю відповідають вимогам ДАК МОН України щодо публікації основного змісту дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук. Зміст автореферату повністю відповідає основним положенням дисертації.

**Відповідність дисертації вимогам ДАК МОН України.** Дисертаційна робота Ісаєвої О.В. побудована згідно вимог ДАК МОН України і включає в себе всі відповідні розділи.

Дисертація складається зі вступу, восьми розділів, висновків, списку використаних джерел з 473 найменувань. Загальний обсяг роботи 332 сторінки, основна частина дисертації викладена на 267 сторінках, містить 9 таблиць і 115 рисунків.

У вступі Ісаєвою О. В. обґрунтована актуальність теми дисертації, сформульовано мету, завдання, об'єкт і предмет дослідження, наведено методи дослідження, викладені наукова новизна та практичне значення отриманих результатів, наведені дані про особистий внесок, публікації та апробацію результатів дисертації.



Перший розділ роботи – літературний огляд викладено на 51 сторінці машинописного тексту, що не перевищує 20 % обсягу основної частини тексту дисертаційної роботи. У розділі наведено детальний аналіз наявних в літературі даних по обраному напрямку досліджень та їх узагальненню. Представлено аналітичний огляд літератури щодо поширеності, причин і наслідків епілептичних нападів у дитячому віці; сучасних експериментальних моделей епілепсії у вивченні механізмів і впливів епілептичних нападів на функціонування ЦНС. Також детально висвітлені сучасні явлення про епілептогенез та скроневу епілепсію. Автором роботи наголошено, що «численні клінічні спостереження і дослідження на різних експериментальних моделях переконливо вказують на те, що дисфункція гематоенцефалічного бар'єру може бути важливим фактором ризику розвитку набутої епілепсії у подальшому житті, але зв'язок між відповідними процесами залишається значною мірою невивченим. В останньому підрозділі літературного огляду автор наводить літературні дані щодо залучення тромбіну і його рецепторів у численні процеси, важливі для функціонування мозку, як у нормі, так і при різноманітних патологічних станах. Аналізуючи цей матеріал Ісаєва О. В. робить припущення, що тромбін і його рецептори можуть відігравати суттєву роль у розвитку набутої епілепсії, пов'язаної з порушенням гематоенцефалічного бар'єру. Це припущення автор роботи досліджує в розділі 7 дисертаційної роботи. Літературний огляд завершується резюме, у якому автор обґрунтовує актуальність теми свого дослідження.

У другому розділі «Матеріали та методи досліджень» наведені основні відомості про об'єкти, експериментальні моделі та методи досліджень, що використовувались в дисертації, зокрема, про електрофізіологічні, гістологічні, лабораторні методи, поведінкові тести та методи статистичного аналізу. Зазначено, що усі експерименти в роботі були виконані у відповідності до існуючих вимог і положень України і Європейської конвенції із захисту

хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях.

У наступних п'яти розділах наведені результати дисертаційної роботи. Третій розділ роботи присвячено дослідженню впливу повторюваних судомних нападів, спричинених у новонароджених щурів інгаляцією флуротилу, на розвиток синаптичної передачі в нейронах гіпокампа щурів. Показано, що у щурів з історією неонатальних судом спостерігалось суттєве зниження амплітуди гальмівних постсинаптичних струмів, без змін інших характеристик цих струмів. Характеристики збуджувальних постсинаптичних струмів не розрізнялись між досліджуваними групами. Отримані дані свідчать, про наявність змін балансу збудження і гальмування в гіпокампі у тварин з історією судом в період раннього розвитку і може бути підґрунтям підвищеної чутливості цієї ділянки мозку у таких щурів до дії проепілептичних агентів, що було описано в попередніх роботах. Зниження функції ГАМК-ергічної синаптичної передачі після неонатальних судом простежується і в дослідях на нейронах соматосенсорної (Розділ 4) і префронтальної кори (Розділ 5), що вказує на загальні механізми впливу таких судом на гальмівну синаптичну передачу в різних ділянках мозку. Цікаво, що на відміну від досліджень на нейронах гіпокампа і префронтальної кори в нейронах соматосенсорної кори неонатальні напади викликали суттєве підвищення функції збуджувальної синаптичної передачі, що вказує на більшу сприйнятливості цієї ділянки мозку до ранніх судом. В розділах 4 і 5 також представлені дані щодо впливу неонатальних судом на збудливість нервових мереж і синаптичну пластичність в нейронах неокортекса, що може бути підґрунтям для розуміння розвитку набутої епілепсії і порушень поведінки у щурів з епілептичними нападами в період раннього розвитку. В розділі 6 наводиться детальна характеристика розробленої за участю автора нової експериментальної моделі епілептиформної активності, локалізованої в межах префронтальної кори. З використанням цієї



моделі наводиться аналіз впливу локальної епілептиформної активності в ранній період життя на синаптичну пластичність в цій ділянці мозку і поведінкові феномени дорослих щурів. Показано, що така активність призводить до змін у пластичності у синапсах медіальної зони префронтальної кори і спричиняє хронічні зміни у поведінці щурів, так спостерігався значний дефіцит уваги та соціальної поведінки щурів. Дуже цікаві результати отримано при дослідженні ролі тромбіну і його рецептора (протеазаактивованого рецептора 1) в епілептогенезі, спричиненому епілептичним статусом (розділ 7). В першій серії дослідів дисертант встановлює підвищення рівня тромбіну і зміни експресії протеазаактивованих рецепторів 1 в мозковій тканині після епілептичного статусу. Експерименти з залученням специфічного інгібітору цих рецепторів дозволяють простежити залучення цих рецепторів у різних патологічних процесах в нервовій тканині, спричинених епілептичним статусом. Доведено нейропротекторну і антиепілептичну роль пригнічення протеазаактивованих рецепторів 1 після епілептичного статусу.

Восьмий розділ присвячений аналізу та узагальненню одержаних в дисертаційній роботі результатів. Ісаєва О. В. коротко наводить основні результати, співставляє їх із даними інших авторів і робить відповідні узагальнення.

Висновки дисертації повністю відповідають її змісту, конкретно і стисло висвітлюють основні наукові результати.

### **Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.**

При розгляді роботи виникла необхідність зробити ряд зауважень і побажань.

1. В роботі як одна із експериментальних моделей епілепсії використана флуротилова модель повторюваних неонатальних судомних нападів, коли вдихання флуротилу викликало у щурят характерні електрофізіологічні і поведінкові ознаки епілептичних нападів. В описі методики вказано, що така

процедура повторювалася кожні дві години 5 разів впродовж доби, однак при такому описі не зовсім зрозуміло, чи проводилася ця процедура в нічний час доби.

2. Вкрай цікавими є дані автора про вплив індукованих нападів в ранній неонатальний період на підвищену епіготовність нейронів соматосенсорної кори. Разом з тим, з точки зору фізіологічної логіки, виглядає важливим і питання про те, чи можуть за таких обставин спостерігатися подібні зміни і в моторних зонах кори, які власне то і є основним джерелом всіх моторних проявів самої епілепсії.
3. Висновки 8 і 9 лише констатують, що як судомні напади, викликані флуротилом, так і індукція епілептиформної активності локалізованої в префронтальній корі, зумовлюють в подальшому хронічне підвищення посттетаничної потенціалії в синапсах як між шарами 2/3 і 5, так і в межах шару 5 медіальної префронтальної кори, тому в рамках загальної дискусії хотілося б почути думку автора стосовно того, чи можна вважати ці зміни посттетаничної потенціалії основою судомної готовності.

До зауважень слід додати і те, що в роботі зустрічаються деякі стилістичні помилки. Однак ці зауваження суттєво не впливають на основні положення дисертаційної роботи.

Зважаючи на все вищесказане вважаю, що дисертаційна робота *Ісаєвої Олени Валентинівни* «Вплив епілептиформної активності на функціонування головного мозку щурів», що подана на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук, за актуальністю теми, об'ємом виконаних досліджень, теоретичним та практичним значенням одержаних результатів, методичним і теоретичним рівнем, обсягом проведених досліджень, новизною одержаних експериментальних даних, обґрунтованістю теоретичних висновків і науковою важливістю для сучасної фізіології цілком відповідає всім вимогам пп. 11, 12 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання



старшого наукового співробітника», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 року № 567, а її автор заслуговує присудження наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю фізіологія людини і тварин – 03.00.13.

**Офіційний опонент:**

Завідувач кафедри  
фізіології людини і тварин  
ІНЦ «Інститут біології»  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка  
доктор біологічних наук, професор



Макарчук М. Ю.

Підпис професора Макаρχука М. Ю. засвідчую:

Вчений секретар НДЧ  
Київського національного університету  
імені Тараса Шевченка

Караульна Н.В.

