

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

Кандидата біологічних наук, доцента кафедри фізіології людини і тварин
Волинського національного університету ім. Лесі Українки

Кузнецова Іллі Павловича

на дисертаційну роботу молодшого наукового співробітника Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця Запужляк Ольги Сергіївни

*«Епілептиформна активність гіпокампа щурів за умов повної або часткової
блокади синаптичної передачі»*

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

Актуальність теми

Дисертаційна робота Запужляк Ольги Сергіївни *«Епілептиформна активність гіпокампа щурів за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі»* присвячена дослідженню механізмів розвитку патологічної синхронізації активності нейронів гіпокампа. Епілепсія є поширеним неврологічним розладом, що має високу частоту порівняно із іншими вродженими хворобами (10 випадків на 1000 осіб). Нажаль, до сьогодні досі питання ефективного лікування епілепсії залишається відкритим. А механізми надмірної схильності певних мозкових структур до епілептичної гіперсинхронізації залишаються недостатньо зрозумілими. Серед чисельних форм епілепсій найбільш розповсюдженою є скронева епілепсія, що характеризується наявністю вогнищ судомної активності в скроневій частці великих півкуль, де зокрема розташований гіпокамп. Гіпокамп – це довгаста структура аллокортексу, що відома своєю роллю в процесах пам'яті та орієнтації в просторі. З анатомічної точки зору характерною особливістю гіпокампа є ламінарне та щільне розташування нейронів та циклічність більшості синаптичних зв'язків. Завдяки такій будові гіпокамп має високу схильність до генерації гіперсинхронізованої активності нейронів. Навіть під час блокади синаптичної передачі в умовах експериментів *in vitro* нейронні мережі гіпокампа

здатні генерувати та підтримувати досить характерну епілептиформну активність. З'ясування механізмів та факторів що сприяють патологічній синхронізації активності нейронів в гіпокампі дозволить покращити сучасні методи контролю та запобігання судомних станів. Дисертаційна робота Запукляк О. С. присвячена вивченню епілептиформної активності нейронних мереж гіпокампа, яка виникає в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі; ця тема є високоактуальною враховуючи значну роль гіпокампа в розвитку епілептичних станів.

Наукова новизна отриманих результатів

В дисертаційній роботі описано характеристики епілептиформної активності, що виникає в зонах гіпокампа СА3 та СА1 під час повної або часткової блокади синаптичної передачі. Показано, що під час часткового блокування істотної частини синаптичних процесів шляхом суперфузії зрізів мозку щурів розчином з антагоністами глутаматних АМПА- та НМДА-рецепторів та ГАМК рецепторів в гіпокампі виникає характерна епілептиформна активність – польові розряди. Натомість, під час повного блокування синаптичних процесів в гіпокампі (шляхом вилучення іонів кальцію з позаклітинного розчину або шляхом блокади кальцієвих каналів кадмієм хлоридом) польові розряди не виникають, а переважним проявом синхронізації активності нейронів в таких умовах є популяційні спайки. В роботі вперше показано, що рівень синхронізації активності в зонах СА3–СА1 під час часткової блокади є значно вищим, ніж в умовах повної блокади. Одержані результати вказують на існування додаткового механізму синхронізації нейронних мереж гіпокампа, котрий не залежить від стану глутаматергічної та ГАМК-ергічної провідностей. Враховуючи, що переважна більшість синаптичних зв'язків між СА3 та СА1 є глутамат- або ГАМКергічними, це спостереження дозволяє по-новому подивитись на проблему епілепсії та на перспективу розробки нових засобів для її ефективного лікування. В роботі також вперше показано роль нікотинових холінорецепторів в синхронізації активності нейронів гіпокампа в умовах часткової

блокади синаптичної передачі. Автором роботи з'ясовано, що неселективні антагоністи нікотинових холінорецепторів – мекаміламін та тубокурарин припиняють генерацію та CA3–CA1 синхронізацію епілептиформної активності, яка виникала в розчині з АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністами. Натомість селективні антагоністи $\alpha 7$ - та $\alpha 4\beta 2$ -н-холінорецепторів не мають істотного впливу на цей процес. Зважаючи, що згадані вищі рецептори є найбільш розповсюдженими в гіпокампі, неефективність відповідних селективних антагоністів в припиненні патологічної синхронізації нейронів гіпокампа, та здатність мекаміламіну її пригнічувати вказує на можливу роль $\alpha 3\beta 4$ -підтипу н-холінорецептрів. Таким чином в роботі показано, що нікотинові холінорецептори беруть участь в синхронізації активності мереж гіпокампа CA3 CA1 незалежно від стану глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичної передачі. В роботі також було досліджено вплив антагоністів холінорецепторів на інтенсивність епілептиформної активності в «класичних» *in vitro*-моделях епілепсії. Отримані результати свідчать про істотну роль н-холінорецепторів в розвитку бікулініндукованої гіперсинхронізації в гіпокампі.

Практичне та теоретичне значення результатів дисертаційної роботи

Результати дисертаційної роботи мають важливе теоретичне та практичне значення. Зокрема в роботі показана здатність нейронних мереж CA3–CA1 гіпокампа до синхронізації активності незалежно від стану глутамат- та ГАМК-ергічної синаптичних систем. З'ясовано, що активація н-холінорецепторів є критично необхідною для CA3–CA1 синхронізації епілептиформної активності, що виникає в присутності АМПА-, НМДА- та ГАМК-антагоністів. Результати даної роботи вказують на потенційну роль нікотинових холінорецепторів як можливої фармакологічної мішені при розробці протиепілептичних засобів. Показано, що антагоніст нікотинових ацетилхолінових рецепторів мекаміламін (зареєстрований 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. Сьогодні в наукових лабораторіях світу вивчається ефективність мекаміламіну в лікуванні деяких психіатричних розладів та різних форм залежності. Таким чином, одержані в дисертацій роботі результати мають практичне значення для розробки нових засобів контролю та запобігання судомної активності в гіпокампі, а також частково пояснюють механізми терапевтичної дії мекаміламіну в ЦНС.

Ступінь обґрунтованості та достовірності наукових положень та висновків дисертаційної роботи

Сформульовані в дисертаційній роботі висновки ґрунтуються на застосуванні адекватних методів, які повністю відповідають сучасним науковим стандартам досліджень в області досліджень епілепсії на тваринних моделях. Кількість та якість отриманих даних дозволяє робити обґрунтовані висновки. Отримані записи епілептиформної активності аналізували за допомогою сучасних програмних засобів (WinWCP та Clampfit). Методи статистичного аналізу є адекватними структурі та кількості отриманих даних: 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. Результати представлені як середні значення \pm стандартне відхилення (s.d., середнє квадратичне). Рівень синхронізації епілептиформної активності, що виникала одночасно в CA1 та CA3 оцінювали за допомогою крос-кореляційного аналізу із визначенням коефіцієнта кореляції та рівня його статистичної достовірності. Загалом висновки дисертаційної роботи базуються на достатній кількості вимірів та їх адекватному статистичному аналізі.

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

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

Дисертаційна робота Запужляк О.С. представлена за загально-прийнятою 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 (206 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 ацетилхолінових рецепторів в модуляції активності цієї церебральної структури. Також в розділі 1 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 – свіжоізолюваних зрізів гіпокампа щурів – як адекватної дослідницької моделі, розглянуто методи індукції спонтанної епілептиформної активності в свіжоізолюваних зрізах мозку щурів, описано методи реєстрації такої активності в зонах гіпокампа СА3 та СА1. Розділ 2 містить детальний опис отримання свіжоізолюваних зрізів мозку щурів, приготування розчинів штучної спинномозкової рідини та модифікації хімічного складу цього розчину з метою виклику епілептиформної активності в зрізах гіпокампа. В розділі наведені приклади різних видів епілептиформної активності в гіпокампі та методи її індукції. В розділі 2 також детально описано методи статистичної обробки отриманих результатів. Всі наведені відомості у розділі 2 дозволяють відтворити процедуру експерименту.

Розділ 3 «Результати досліджень» містить 8 підрозділів, в яких з логічною послідовністю описано отримані результати. А саме в розділі наведено характеристики епілептиформної активності, що виникає в гіпокампі під час повної або часткової блокади синаптичної передачі, порівняно її основні параметри, виявлено істотні відмінності. Наведені дані щодо рівня синхронізації епілептиформної активності в зонах СА3 та СА1 гіпокампа під час блокування синаптичної передачі. Показано роль зони СА3 в генерації та розповсюдженні епілептиформної активності, що виникала в розчині з АМПА-, НМДА та ГАМК-антагоністами. Також наведено отримані результати щодо впливу холінергічних антагоністів на генерацію епілептиформної активності під час часткової блокади синаптичної передачі та в умовах моделей епілепсії *in vitro*. Розділ містить значну кількість рисунків, що детально ілюструють отримані результати.

Розділ 4 «Обговорення результатів» складається з 3 підрозділів, в яких наведено аналіз отриманих результатів стосовно порівняння характеристик епілептиформної активності в зонах гіпокампа СА3 та СА1 в умовах повної або часткової блокади синаптичної передачі. Проаналізовано вплив антагоністів холінорецепторів на розвиток та СА3-СА1-синхронізацію епілептиформної активності в гіпокампі. Проведено порівняння отриманих результатів із актуальними роботами інших дослідників, що дозволяє в повній мірі оцінити значення дисертаційного дослідження для розуміння теоретичних механізмів епілепсії та практичних підходів у її лікуванні.

Запитання та зауваження

1. Твердження автора, що в дисертаційній роботі вперше показана роль нікотинових холінорецепторів в епілептиформній синхронізації активності нейронів гіпокампа в умовах блокади глутамат-та ГАМКергічної передачі не є зовсім коректним – подібні результати були отримані, наприклад в роботі Gruslin, Descombes, Psarropoulou (Brain Research (835), 1999, P. 290–297).

2. Автор розглядає роль у епілептиформній активності таким медіаторів як, глутамат, ацетилхолін, ГАМК, проте ніяк не обумовлює можливу роль дофаміну (див., наприклад, роботу Kempadoo et al, 2016: <https://www.pnas.org/content/113/51/14835.long>).
3. Ритмічна електрична активність мозку та гіпокампу зокрема (в т.ч. епілептичного характеру) є результатом не тільки внутрішніх процесів в самому гіпокампі, але й його комунікації із іншими відділами головного мозку – гіпокамп відомий як структура мозку, що включений у значну кількість нейронних ланцюгів мозку (див. наприклад, роботу Buzsáki, Diba, 2010: https://www.researchgate.net/figure/Multiple-loops-of-the-hippocampal-entorhinal-circuits-The-long-loop-connecting-the-layer_fig1_283408850).
Автору було б варто зазначити, як його результати можуть узгоджуватися із уявленнями про ритмічну активність гіпокампу в цілому мозку.
4. Для розуміння природи ритмічної (в т.ч. епілептичної) активності нейронних структур активно використовуються численні математичні моделі, насамперед, з області нелінійної динаміки. Чи відомі автору подібні моделі і чи можна порівняти результати дисертаційного дослідження із даними, отриманими завдяки таким моделям?
5. Автор періодично припускає наявність додаткового синаптичного механізму, який синхронізує активність ділянок гіпокампу. На мій погляд, бажано було б навести декілька можливих кандидатів на роль цього механізму.
6. Чи є термін «латентний час» загальноприйнятим в літературі в області дослідження? Можливо, використання терміну «латентний період» було б більш доцільним.
7. Не зовсім зрозумілий вибір стандартного відхилення для відображення розкиду даних на графіку – при застосуванні стандартної похибки наявність статистично достовірної різниці було б простіше оцінити візуально.

Вказані зауваження мають характер уточнення і не знижують наукову цінність дисертаційної роботи.

Висновок

Дисертаційна робота Запужляк Ольги Сергіївни на тему *«Епілептиформна активність гіпокампа щурів за умов повної або часткової блокади синаптичної передачі»* є завершеним науковим дослідженням, що вносить істотний вклад у розуміння механізмів розвитку патологічної синхронізації нейронів гіпокампа в умовах блокади синаптичної передачі. Вважаю, що дисертаційна робота Запужляк О. С. повністю відповідає всім вимогам до дисертаційних робіт (пункти 9, 13 «Порядку присудження наукових ступенів», затверджено постановою Кабінету Міністрів України від 24.07.2013 №567 (зі змінами, внесеними в постановах Кабінету Міністрів України № 656 від 19.08.2015, № 1159 від 30.12.2015 та № 567 від 27.07.2016), а її автор – Запужляк Ольга Сергіївна, заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин.

Офіційний опонент:

Доцент кафедри фізіології людини і тварин

Волинського національного університету

імені Лесі Українки

кандидат біологічних наук

Кузнецов Ілля Павлович

