

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ергинной Юлии Леонидовны

«Функциональные изменения свойств глутаматергической синаптической передачи в гиппокампе и энторинальной коре крысы в модели эпилептиформной активности *in vitro*», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных

Актуальность темы работы

Височная эпилепсия – широко распространенная форма эпилепсии человека, она составляет более половины всех случаев фокальной эпилепсии, а в 30% случаев больные височной эпилепсией являются фармакорезистентными к большинству противоэпилептических препаратов. Расширение наших представлений о механизмах, лежащих в основе височной эпилепсии, будет способствовать разработке новых методов терапии. В этом состоит острая актуальность представленной диссертационной работы.

Ранее было показано, что эпилептическая активность при височной эпилепсии приводит к аномальной синхронизации в замкнутой энторинально-гиппокампальной петле синаптических связей, что, в свою очередь, играет ключевую роль в генерации и поддержании аномальной эпилептиформной активности. Вследствие прохождения эпилептической активности нейронные сети энторинальной коры и гиппокампа могут претерпевать существенные перестройки и способны эпилептизироваться, то есть становиться источником эпилептической активности в дальнейшем. Однако, в настоящее время остается неясным, к каким именно изменениям на нейронном и синаптическом уровнях приводит эпилептическая активность в данных структурах. Также нет четкого представления о сроках происходящих изменений.

Для решения этой задачи автором диссертационной работы использована модель височной эпилепсии *in vitro*: диссертант провела исследование биофизических свойства нейронов и особенностей глутаматергической синаптической передачи в энторинальной коре и гиппокампе крыс на переживающих срезах мозга. Данная модель, в которой частично сохранены связи между отдельными структурами (между энторинальной корой и гиппокампом), позволяет исследовать тонкие механизмы, лежащих в основе височной эпилепсии.

Новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В представленной работе в модели *in vitro* на переживающих срезах мозга впервые было показано, что развитие и эпилептиформной активности, как иктальный, так и интериктальный периоды, происходит одновременно в двух структурах височной доли – энторинальной коре и гиппокампе, в то же время иктальная активность в энторинальной коре более длительная по сравнению с гиппокампом.

В диссертационной работе Ергинной Ю.Л. впервые получены новые данные о роли вызванной эпилептиформной активности на переживающих срезах *in vitro* на глутаматергическую передачу в синапсах двух структур височной доли: энторинальной коре и гиппокампе крыс. Впервые показано, что эпилептиформная активность *in vitro* приводит к увеличению AMPA/NMDA соотношения в изучаемый период и в энторинальной коре, и в области CA1 гиппокампа. Показано, что меняется вклад синаптических проводимостей трех основных ионотропных рецепторов: AMPA-, NMDA- и ГАМКа-рецепторов. На начальном этапе развития эпилептиформные разряды 2 типа возникали за счет изменения проводимости ГАМКа-рецепторов. В дальнейшем глутаматные AMPA- и NMDA-рецепторы опосредовали более поздний компонент. Эпилептиформные разряды 1 типа были опосредованы сугубо проводимостью ГАМКа-рецепторов. Таким образом, впервые было показано, что синаптические проводимости основных типов ионотропных рецепторов меняются в ходе эпилептиформной активности *in vitro*. Полученные автором новые данные убедительно указывают на важную роль AMPA-рецепторов в процессах синаптической пластичности, запускаемых эпилептиформной активностью. Анализ мембранных биофизических свойств нейронов показал, что вызванная эпилептиформная активность не влияла на данные показатели (входное сопротивление, потенциал покоя, временную константу мембраны, форму потенциалов действия) нейронов области CA1 гиппокампа не изменялись. Эпилептиформная активность в срезах мозга также не приводила к изменению вероятности выброса глутамата как в синапсах энторинальной коры, так и синапсах области CA1 гиппокампа.

Теоретическая значимость работы заключена в том, что в результате проведения диссертационного исследования были получены новые данные о механизмах генерации и последствиях вызванной эпилептиформной активности *in vitro* как в энторинальной коре, так и в гиппокампе. Практическая значимость работы состоит в том, что данные о характере и временной динамике изменений AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованной синаптической активности в энторинальной коре и гиппокампе могут быть использованы при разработке новых подходов к терапии височной эпилепсии, в том числе для поиска фармакологических агентов, воздействующих на глутаматергическую передачу.

Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов

Представленные в работе результаты исследований полностью обоснованы, получены с применением надежных экспериментальных методов и подходов. Использованные в работе электрофизиологические методы регистрации спонтанных и вызванных ответов всецело соответствуют поставленным задачам. Методы статистической обработки и математические подходы к оценке синаптических проводимостей применены адекватно. Автор представил в своей диссертационной работе большой объем

экспериментального материала. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Основные положения, выносимые на защиту, отражают новизну, актуальность и практическую значимость работы и полностью соответствуют представленным в диссертационной работе экспериментальным данным. Результаты не противоречат данным литературных источников и приняты к публикации в рецензируемые научные издания, в том числе международные. Обоснованность выводов подтверждается глубоким обсуждением материала и сопоставлением собственных экспериментальных данных с данными мировой литературы по теме диссертации.

Структура и оформление работы

Диссертационная работа представляет собой завершенное научное исследование, построенное по традиционному плану. Текст диссертационного исследования изложен на 125 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка использованных источников. Диссертация содержит 29 рисунков, список литературы включает 353 литературных источника, подробно и объективно представляя весь спектр научной литературы по данному вопросу. Основные положения диссертации отражены в 18 печатных работах, в том числе в 5 статьях, опубликованных в журналах, рекомендованных ВАК.

Во введении кратко изложено текущее состояние изучаемой проблемы, обоснован выбор объекта исследования и модели эпилептиформной активности. Четко сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения об апробации работы. Изложенные во введении цели и задачи диссертации полностью соответствуют положениям, выносимым на защиту и сформулированным в конце работы выводами.

Глава «Обзор литературы» содержит подробно проработанный, глубокий анализ научной литературы, посвященной исследованиям височной эпилепсии с акцентом на механизмы, лежащие в основе генерации эпилептической активности. Рассмотрены *in vitro* модели эпилептиформной активности, наиболее часто используемые в исследованиях. Проанализированы изменения глутаматергической синаптической передачи, как на пресинаптическом, так и на постсинаптическом уровне, ассоциированные с эпилептической активностью. Приведены современные данные о влиянии эпилептической активности на состав и свойства ионотропных глутаматных рецепторов.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных автором методик и методических подходов, необходимую информацию об объекте исследования и используемой модели эпилептиформной активности *in vitro*.

Кратко и четко описаны основные этапы приготовления переживающих срезов мозга крысы, приведен состав перфузирующих растворов, используемых для вызова

эпилептиформной активности в срезе. Перфузия переживающих срезов мозга проэпилептическим раствором позволила авторам провоцировать развитие эпилептоидной активности в паре выбранных структур (энторинальная кора и гиппокамп), провоцируя как иктальные события, так и исследуя характеристики нервной ткани в интериктальный период. В работе представлен широкий спектр подходов к регистрации электрофизиологической активности, в зависимости от поставленной задачи, регистрировались: полевые постсинаптические потенциалы, спонтанные и вызванные постсинаптические токи отдельных нейронов. Особо отмечу, что автор продемонстрировала владение методом одновременной регистрации синаптической активности двух нейронов. Адекватный профессиональный подход к обработке и последующему анализу регистрируемой электрофизиологической активности продемонстрировал достоверность полученных результатов.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена автором на несколько частей. Первая часть главы посвящена непосредственно изучению свойств эпилептиформной активности *in vitro* в двух областях мозга: энторинальной коре и гиппокампе. Показано, что эпилептиформная активность, регистрируемая в этих двух областях, имеет схожие черты. Перфузия среза проэпилептическим раствором, содержащим эпилептоген 4-аминопиридин, приводила к появлению как интериктальных, так и иктальных эпилептических разрядов в обеих исследуемых областях. Однако обнаружены и отличия: в энторинальной коре иктальная активность оказалась более длительной. Оценка синаптических проводимостей, опосредованных работой трех типов инотропных рецепторов (AMPA-, NMDA- и ГАМКа-рецепторов), в ходе спонтанных разрядов позволила выявить два типа эпилептиформных разрядов: в ходе эпилептиформных разрядов 1 типа наблюдалась преимущественно ГАМКа-рецептор-опосредованная проводимость, тогда как в случае эпилептиформных разрядов 2 типа ГАМКа-рецептор-опосредованная синаптическая проводимость являлась ведущей только на начальном этапе разряда, после чего, с небольшой задержкой, возрастала проводимость, опосредованная возбуждающими глутаматными рецепторами AMPA и NMDA типа.

Во второй части главы представлены данные об эффекте, который период эпилептиформной активности *in vitro* оказал на биофизические свойства нейронов и на глутаматергическую синаптическую передачу в энторинальной коре и гиппокампе в течение часа после воздействия. Проведена подробная оценка как возможных пресинаптических, так и постсинаптических изменений глутаматергической передачи в обоих структурах. Для оценки пресинаптических изменений было применено два метода: метод оценки ответов на парный стимул и метод оценки частоты миниатюрных событий. Было показано, что эпилептиформная активность *in vitro* не повлияла на пассивные и активные мембранные свойства пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа, не

изменилась и вероятность высвобождения глутамата в синапсах энторинальной коры и области СА1 гиппокампа. В то же время, и в гиппокампе, и в энторинальной коре наблюдалось увеличение AMPA-рецептор-опосредованного компонента синаптических ответов после краткого периода эпилептиформной активности *in vitro*.

Обсуждение результатов проведено автором в сопоставлении своих данных с литературными. Автор выдвигает гипотезу, что наблюдаемое увеличение AMPA-рецептор-опосредованного компонента ответа связано со встраиванием дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану, что согласуется с литературными данными об увеличении уровня поверхностной экспрессии белков субъединиц AMPA-рецепторов после перенесенных судорог. Полученные автором новые данные свидетельствуют о том, что период эпилептиформной активности *in vitro* оказывает наиболее сильное влияние, в частности, на AMPA-рецептор-опосредованную синаптическую передачу.

Выводы сформулированы ясно и логично, полностью обоснованы и четко отражают суть полученных в исследовании результатов.

Вопросы к диссертанту.

1) Автор исследования указывает, что в работе были использованы крысы линии Вистар 20–22 дней жизни. В связи с этим возникает вопрос: почему были выбраны не взрослые животные? Была ли какая-то связь такого выбора с развитием височной эпилепсии именно у подростков? Есть ли данные о взаимосвязи возраста животных, использованных для приготовления срезов, с особенностями развития эпилептической активности в вашей модели?

2) Второй вопрос также касается деталей методики. Почему проэпилептический раствор 1 (ПР1) и проэпилептический раствор 2 (ПР2) содержали 4-АП в различной концентрации?

В качестве замечания отмечу, что в тексте диссертации не указано число животных, использованных для приготовления срезов. Безусловно, при использовании методики переживающих срезов число животных является достаточно формальным показателем, но должно быть указано.

Диссертационная работа Ергиной Ю.Л. аккуратно оформлена, богато иллюстрирована и является полностью завершенным научным исследованием. Результаты работы опубликованы в 5 печатных работах, включенных в перечень ВАК. три из них входят в первый квартиль (Q1) по версии базы данных Web of Science, в трех статьях Ергина Ю.Л. является первым автором. Материал диссертации неоднократно докладывался на многочисленный всероссийских и международных конференциях, включая Съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова, Съезд физиологов СНГ и 11th FENS Forum of Neuroscience.

