



ФГБНУ НЦН

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НЕВРОЛОГИИ»

Волоколамское шоссе, д. 80, Москва, 125367, тел.: (495) 374-77-76, факс: (495) 490-22-10

Электронная почта: center@neurology.ru, интернет-сайт: http://www.neurology.ru

ОКПО 01897653, ОГРН 1027739766812, ИНН/КПП 7733012151/773301001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ «Научный центр неврологии»

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,

М.А. Пирадов

2023 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической ценности диссертации

Ергиной Юлии Леонидовны

на тему «Функциональные изменения свойств глутаматергической синаптической передачи в гиппокампе и энторинальной коре крысы в модели эпилептиформной активности *in vitro*»,

представленной к защите в диссертационный совет 24.1.152.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных

Актуальность исследования

Эпилепсия - распространенное неврологическое заболевание, одним из видов которого является височная эпилепсия. Среди других форм фокальной эпилепсии человека височная эпилепсия принадлежит к наиболее часто встречающимся видам фармакорезистентной эпилепсии у взрослых. Вопросы, связанные с выявлением механизмов генерации судорожной активности и

развитием резистентности к фармакологическим препаратам у пациентов, страдающих эпилепсией, являются актуальными для современной медицины и фундаментальной нейробиологии. Однако до сих пор нет полного понимания механизмов возникновения патологической синхронизированной активности в нейронных сетях, что затрудняет выбор эффективной стратегии предотвращения и лечения эпилепсии. Поэтому диссертационная работа Юлии Леонидовны Ергиной, посвященная изучению механизмов формирования спонтанной синхронной активности нейронов гиппокампа и энторинальной коры и выявлению роли изменений свойств возбуждающей синаптической передачи в генерации и поддержании судорожной активности, является актуальной для как фундаментальной нейробиологии, так и клинической практики.

Новизна исследования и полученных результатов

Основные положения диссертационной работы Ю.Л. Ергиной являются новыми и приоритетными. Автором впервые проведено комплексное сравнительное исследование развития эпилептиформной активности *in vitro* одновременно в двух структурах височной доли – энторинальной коре и гиппокампе. Именно эти структуры играют ключевую роль в генерации и поддержании аномальной синхронизированной активности. В проведенной работе показано, что в обеих структурах наблюдаются как иктальная, так и интериктальная активность, однако в энторинальной коре эпизоды иктальной активности имеют большую длительность, чем в гиппокампе. Автором впервые показано, что в ходе эпилептиформной активности *in vitro* меняется вклад синаптических проводимостей трех основных ионотропных рецепторов: глутаматных рецепторов AMPA и NMDA типа и ГАМК_A рецепторов. Обнаружено, что интериктальные эпилептиформные разряды связаны с изменениями проводимости ГАМК_A рецепторов, а при развитии иктальной активности ранний компонент ответа опосредован ГАМК_A рецепторами, в то время как AMPA и NMDA рецепторы обеспечивают поздний компонент.

Изменений биофизических свойств нейронов области CA1 гиппокампа и вероятности выброса глутамата как в синапсах энторинальной коры, так и синапсах области CA1 гиппокампа, при этом обнаружено не было.

Большую научную и практическую ценность представляет полученные в работе данные, свидетельствующие о том, что краткий период эпилептиформной активности приводит к быстро развивающимся постсинаптическим изменениям глутаматергической передачи в энторинальной коре и гиппокампе, проявляющимися в форме потенциации компонента вызванных ответов опосредованных AMPA рецепторами. Впервые было показано, что эпилептиформная активность приводит к увеличению соотношения AMPA/NMDA компонентов ответа как в энторинальной коре, так и в области CA1 гиппокампа. В целом, проведенное исследование позволило сделать вывод о том, что AMPA рецепторы играют важную роль в процессах синаптической пластичности, запускаемых эпилептиформной активностью.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций

Работа выполнена на модели судорожных состояний, возникающих в переживающих срезах головного мозга крыс, содержащих энторинальную кору и гиппокамп. Выбор этих структур обусловлен тем обстоятельством, что замкнутая энторинально-гиппокампальная синаптическая петля играет ключевую роль в генерации и поддержании синхронизированной эпилептической активности у пациентов с эпилепсией височной доли. В работе использованы современные электрофизиологические методы, включающие регистрацию полевых постсинаптических потенциалов и спонтанной и вызванной синаптической активности методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока и/или напряжения. Данные методы являются надежными и адекватным для решения поставленных задач. В экспериментах по регистрации вызванных

постсинаптических токов для оценки относительного вклада AMPA, NMDA и ГАМК_A рецепторов в вызванный ответ использовался математический подход, основанный на аппроксимации вольт-амперных характеристик синаптических токов, опосредованных каждым из этих рецепторов.

Обоснованность исследования и оригинальность полученных результатов подтверждается публикацией материалов работы в рецензируемых высокорейтинговых научных журналах (5 статей, из них три в журналах, индексируемых аналитической базой Web of Science, и две статьи в журналах, входящих в РИНЦ). Результаты работы были представлены на авторитетных отечественных и международных конференциях и обсуждены научным сообществом.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных в работе результатов не вызывает сомнений. В диссертационном исследовании использованы современные электрофизиологические методы, адекватные поставленной цели. Дизайн экспериментов оптимален для задач исследования. Научные положения и гипотезы, предложенные автором, объективны и обоснованы полученными результатами и опираются на глубокий анализ современных представлений о механизмах эпилептогенеза. Объем и качество полученных данных, их представление, а также обработка с использованием адекватных современных методов математической и статистической обработки данных позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными.

В целом, анализ результатов позволяет заключить, что все выводы и положения, выносимые защиту, достоверны и обоснованы. Цель и все поставленные в диссертационном исследовании задачи полностью выполнены, что отражено в выводах работы.

Научная и практическая ценность диссертации

С использованием *in vitro* моделей в диссертационной работе получены фундаментальные результаты, демонстрирующие, что кратковременные эпизоды эпилептиформной активности вызывают изменения в синаптической передаче, которые приводят к повышению возбудимости в сетях гиппокампа. Полученные данные указывают на то, что нескольких эпилептиформных иктальных эпизодов достаточно, чтобы вызвать быстрые изменения баланса возбуждения и торможения в сетях гиппокампа и, следовательно, могут способствовать ранним фазам прогрессирующего эпилептогенеза. Полученные автором результаты расширяют представления о последовательности и особенностях патофизиологических процессов, происходящих при перевозбуждении нейрональной сети, характерном для определенных патологических состояний, включая эпилепсию. Проведенное исследование позволило выявить участие основных возбуждающих и тормозных рецепторов в формировании этой активности. Автором впервые обнаружено, что синаптические проводимости основных типов ионотропных рецепторов меняются в ходе эпилептиформной активности *in vitro*. Анализ компонентов синаптической передачи показал, что эпилептиформная активность вызывает изменения глутаматергической синаптической передачи, состоящие в нарушении нормального функционирования AMPA и NMDA рецепторов и увеличению соотношения AMPA- и NMDA-рецептор-опосредованных компонентов вызванного ответа.

Полученные данные вносят заметный вклад в существующие представления о механизмах и закономерностях генерации судорожной активности в нейрональных сетях головного мозга, а также могут служить теоретической основой для усовершенствования стратегии коррекции этих состояний и создания нейропротекторных соединений, способных препятствовать патологическим перестройкам в нервной системе при их развитии, что имеет важное практическое значение. Таким образом, выявленные в работе синаптические и клеточные процессы, лежащие в основе генерации эпилептиформной активности, представляют собой потенциальные

мишени для понимания и предотвращения распространения судорожной активности. Кроме того, научно-практическая ценность диссертационной работы Ю.Л. Ергиной определяется оригинальностью полученных в ней результатов, которые будут способствовать дальнейшим углубленным экспериментальным исследованиям клеточных и молекулярных механизмов патогенеза эпилепсии.

Личный вклад автора

Основные научные результаты по теме исследования получены лично соискателем. Участие соискателя в исследовательской работе представлено в опубликованных и реферируемых научных трудах. Судя объему исследований, выполненных автором самостоятельно, а также учитывая сложность использованных методик и высокую репрезентативность экспериментального материала, степень личного вклада автора в подготовку диссертации высока и не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану и содержит оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы. Работа изложена на 125 страницах и включает 29 рисунков. Список литературы включает 353 литературных источника. Материал изложен последовательно и логично, результаты исследования основаны на достаточной выборке. Иллюстративный материал и таблицы наглядны и выполнены на высоком уровне. **Во введении** автор обосновывает актуальность исследования, формулирует его цель и задачи. Определены научная новизна и практическая значимость результатов исследования. В положениях, выносимых на защиту, четко сформулирована суть работы, и все три положения согласованы и объединены целью исследования. Представлены сведения об апробации материалов диссертации и публикациях по теме исследования. **Глава 1** –

обзор литературы – дает актуальное представление о механизмах генерации эпилептической активности, вкладе энторинальной коры и гиппокампа в ее развитие и о моделях и препаратах мозга, используемых в исследованиях эпилептической активности *in vitro*. В обзоре подробно рассмотрена роль глутаматергической системы в развитии эпилепсии.

Глава 2 содержит описание материалов и методов исследования. Дана характеристика модели эпилептиформной активности в переживающем срезе, подробно описаны электрофизиологические методы регистрации, включая регистрацию полевых постсинаптических потенциалов и синаптической активности методом пэтч-кламп, а также описаны методы математической и статистической обработки данных.

Глава 3 посвящена результатам исследования и их обсуждению. Этот раздел хорошо структурирован, написан лаконично и четко. Глава разделяется на подглавы, соответствующие решаемым задачам. Описаны типы эпилептиформных разрядов в энторинальной коре и гиппокампе, представлены данные, полученные при одновременной регистрации эпилептиформной активности в коре и гиппокампе. Описаны биофизические свойства пирамидных нейронов CA1 после периода эпилептиформной активности. Дана характеристика перестроек глутаматергической передачи между синапсами CA3-CA1 гиппокампа и в нейронах энторинальной коры. Показано увеличение базовой синаптической передачи, описаны ее пресинаптические свойства и постсинаптические характеристики. Все материалы проиллюстрированы логично построенными и наглядными рисунками. Завершает Главу 3 обсуждение полученных в ходе исследования данных. Дана характеристика и проведен подробный анализ обнаруженных постсинаптических изменений в энторинальной коре и гиппокампе.

В разделе "**Заключение**" дана общая оценка полученных результатов, проведено сопоставление полученных данных с данными литературы, обсуждаются гипотезы и перспективы дальнейших исследований по теме диссертации.

Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах

Полученные автором результаты полно отражены в 5 журнальных статьях из перечня ВАК (в том числе, в трех опубликованных в зарубежных журналах). В материалах содержится полный объем информации, касающейся темы диссертации. Результаты диссертационного исследования были представлены в виде устных и стендовых докладов и обсуждены на научных конференциях и симпозиумах.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные в диссертационной работе результаты имеют важное практическое значение при изучении механизмов изменений синаптической передачи при дисфункциях нервной системы. Полученные данные важны для разработки и тестирования лекарственных средств, направленных на коррекцию перестроек синаптической передачи во время эпилептогенеза. Ключевые положения работы могут быть включены в курсы лекций по физиологии, нейробиологии и фармакологии в образовательных учреждениях.

Замечания и вопросы

Принципиальных замечаний к работе нет. Есть некоторые замечания, касающиеся оформления работы. Хотя диссертация написана хорошим языком и аккуратно оформлена, в работе встречаются некоторые терминологические неточности, например, "внутреннее выпрямление", "добавочное сопротивление", "эквивалентный потенциал для ГАМК-рецептора" и англицизмы, такие как "спайкование", "интернейрональные AMPA-рецепторы", "даунрегуляция" и др. ,

В порядке дискуссии хотелось бы узнать мнение диссертанта по следующим вопросам, возникающим при чтении работы:

1. Для определения вклада различных синаптических проводимостей в генерацию интериктальных разрядов в энторинальной коре и гиппокампе в работе использован метод оценки постсинаптических проводимостей сразу трех типов ионотропных рецепторов (AMPA-, NMDA- и ГАМК_A типов). Основное внимание уделено изменению свойств глутаматных рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа и энторинальной коры в ответ на epileptiformную активность. Вместе с тем, все три типа исследуемых проводимостей активируются в нейроне одновременно. Может ли вносить искажения в оцениваемые параметры проводимостей глутаматных рецепторов развивающаяся в те же временные интервалы хлорная проводимость, вызванная активацией ГАМК_A рецепторов и приводящая к шунтированию мембраны?

2. В работе описано изменение амплитуды и кинетики вызванных постсинаптических токов, опосредуемых AMPA и NMDA рецепторами, развивающиеся в ходе epileptiformной активности. Наблюдались ли при этом изменения кинетики миниатюрных постсинаптических потенциалов, связанных с активацией глутаматных рецепторов?

3. В работе описана медленная деполяризация мембраны в ходе развития 4-аминопиридин-опосредованной epileptiformной активности. Предполагается, что в основе этого явления лежит увеличение концентрации внеклеточного K⁺, который оказывает прямое деполяризующее действие на мембранный потенциал клетки, или совокупность токов (т. е. Na⁺, K⁺, Cl⁻ и HCO₃⁻), участвующих в формировании медленной деполяризации. Может ли вносить вклад в наблюдаемую деполяризацию активация extrasинаптических ГАМК_A рецепторов, связанная с повышением экстраклеточной концентрации ГАМК в результате усиления активности тормозных интернейронов?

Высказанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на высокий научный и методический уровень диссертационной работы и не меняют общей положительной оценки работы. Вынесенные на

защиту научные положения обоснованы и соответствуют поставленным задачам и целям. Автореферат полностью отражает основные результаты диссертационного исследования, позволяет получить достаточные представления о содержании диссертации и полностью соответствует идеям и выводам диссертации. Выводы являются обоснованными, вытекают из содержания работы, логичны и соответствуют поставленным задачам.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Ергиной Юлии Леонидовны на тему «Функциональные изменения свойств глутаматергической синаптической передачи в гиппокампе и энторинальной коре крысы в модели эпилептиформной активности *in vitro*», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, позволившей получить новые факты, которые вносят существенный вклад в понимание процессов эпилептогенеза, и содержит решение важной научной задачи - выявление факторов и закономерностей развития эпилептической активности, имеющей существенное значение для физиологии человека и животных. По актуальности темы, новизне полученных результатов, теоретической и практической значимости работа Ергиной Юлии Леонидовны соответствует требованиям установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор Ергина Юлия Леонидовна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных.

Отзыв обсужден и принят на заседании научной конференции сотрудников лабораторий функциональной синаптологии Института мозга Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», протокол № 6 от «01» ноября 2023 года.

Ведущий научный сотрудник лаборатории
функциональной синаптологии Института мозга
ФГБНУ «Научный центр неврологии»

д.б.н. (специальность 03.03.06 - Нейробиология) Шаронова И.Н. Шаронова

Даю согласие на сбор и обработку личных данных Шаронова И.Н. Шаронова

Подпись д.б.н. Шароновой И.Н. ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь ФГБНУ НЦН,
кандидат медицинских наук



Д.В. Сергеев