

УТВЕРЖДАЮ

Проректор

МГУ имени М.В. Ломоносова

А.А. Федянин



2023 года

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу
КУЛИКОВА АЛЕКСЕЯ АНДРЕЕВИЧА на тему: Механизмы структурной реорганизации гиппокампа и нижних бугров четверохолмия при эпилептогенезе у крыс линии Крушинского-Молодкиной, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных.

Работа, составившая материал диссертации А.А. Куликова, уникальна и по новизне задачи, и по огромному новому фактическому материалу, который был получен автором. Реально специфичность процессов развития у животных, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии, ранее не анализировалась, и работа А.А. Куликова является первой в этой области нейробиологии.

Актуальность исследования. Поскольку эпилепсия - часто встречающееся неврологическое заболевание, исследования процесса эпилептогенеза на морфологическом и нейрохимическом уровнях с помощью лабораторных моделей судорожных состояний остается актуальной проблемой. Большую важность имеют также генетические модели судорожных состояний, к которым относятся крысы линии Крушинского-Молодкиной (КМ). Такие данные важны и для углубления знаний в области

нейробиологии в целом, но актуальны и для понимания динамики формирования эпилептического процесса, что имеет значение для клиники.

Научная новизна работы. Автор впервые проанализировал возрастную постнатальную динамику процессов в «субстратах» аудиогенной эпилепсии и судорог, индуцированных многократной экспозицией крыс действию звука. Впервые описана задержка развития этих структур у крыс линии КМ, с которой ассоциирована активация ERK1/2 киназ. У молодых и зрелых крыс линии КМ (в фоне, без стимуляции звуком) впервые описана повышенная абберрантная миграция вновь образованных клеток, дифференцированных по глутаматергическому типу. Впервые продемонстрировано, что многократная экспозиция крыс КМ действию звука вызывает появление пролиферирующих клеток в нижних буграх четверохолмия, которые не являются нейрогенной областью, а также стимулирует абберрантный нейрогенез, разрастание мышечных волокон и увеличение плотности синаптических контактов в гиппокампе. Впервые описана гибель нейронов путем апоптоза, которая активируется р53-зависимым и митохондриальным путями, а также активация аутофагии в гиппокампе. Впервые была продемонстрирована возможность использования ингибитора белка р53 пифитрин- α для подавления дифференцировки вновь образованных глутаматергических клеток.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы. Полученные в диссертации А.А. Куликова данные – это важный вклад в существующие представления о механизмах формирования эпилептиформных состояний. Продемонстрированные в работе структурная реорганизация, связанная с абберрантным нейрогенезом и нейродегенерацией открывают возможности для поиска новых терапевтических средств для для коррекции нарушений структуры гиппокампа при эпилепсии (что продемонстрировано выявленными эффектами пифитрин- α). Это означает, что полученные в работе данные важны для неврологии и эпилептологии. Результаты исследований, а также обзор литературы по вопросам, затронутым в диссертации, могут быть

использованы в спецкурсах при подготовке курсов по патофизиологии ЦНС и по генетике поведения в МГУ, СПбГУ, Новосибирском университете, а также в ряде медицинских вузов.

Целью исследования был анализ морфофункциональных особенностей развития дорсального гиппокампа и нижних бугров четверохолмия крыс линии КМ (предрасположенной к развитию интенсивных судорожных припадков в ответ на сильный звук, т.е. к рефлекторной эпилепсии) в ходе формирования судорог, которые в настоящее время рассматриваются, как модель височной эпилепсии человека.

Данная цель послужила основой для формулировки конкретных задач настоящей диссертации. Этими задачами были исследование механизмов нарушений развития структуры гиппокампа и нижних бугров четверохолмия в ходе формирования рефлекторной эпилепсии в постнатальном онтогенезе, особенности нейрогенеза и структуры связей нейронов в этих структурах при развитии процессов, моделирующих височную эпилепсию человека, а также механизмов нейродегенерации при этих процессах.

Материалы, представленные в диссертации А.А. Куликова, показывают, что эти задачи были выполнены.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, опираются на данные, полученные автором экспериментальным путем и обработанные адекватными статистическими методами. Исследования проведены с использованием современных методов, а выводы работы, аргументировано отражающие основные научные положения работы, обоснованы и достоверны.

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку полученных данных, осуществлял их анализ и обобщение, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

Оценивая диссертацию А.А. Куликова следует отметить, что она изложена на 150 страницах и построена по традиционному плану - введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы и список цитируемой литературы (257 источников). Работа содержит 63 рисунка и 3 таблицы.

Большой, подробно иллюстрированный обзор литературы по затронутым в диссертации вопросам, имеет самостоятельное значение, он интересен и важен для понимания процессов эпилептогенеза. Его можно рекомендовать как материал для добротной обзорной статьи.

Известно, что в ряду экспериментальных подходов к анализу эпилептогенеза важное место принадлежит аудиогенной эпилепсии (АЭ) грызунов, описанной еще в 1910-1920 г. г., хотя ее подробное описание и анализ феноменологии были проведены значительно позднее. АЭ грызунов относится к категории рефлекторных эпилептиформных явлений, в клинике эпилепсии человека такие случаи встречаются не часто, однако исследование феноменологии судорожных припадков, физиологических изменений в мозге и ЭЭГ картины при АЭ дали много важных сведений об эпилепсии и физиологии судорожных состояний в целом. И если феноменология припадков АЭ, особенности метаболизма целого ряда важных для мозга соединений, условия модуляции судорожной готовности у животных с АЭ описаны достаточно давно и подробно, онтогенетические особенности формирования АЭ не получали большого внимания.

Как упоминалось выше, А.А. Куликов подробно представил полученные им данные по формированию в постнатальном онтогенезе процессов пролиферации клеток, апоптоза, а также процессов аутофагии у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) в сопоставлении с показателями этих процессов у крыс Вистар. Такие же данные были получены и для структур гиппокампа. Полученные результаты позволили автору сделать заключение об aberrантном ходе процессов формирования структуры нижних бугров четверохолмия и гиппокампа у крыс линии КМ, предрасположенных к АЭ.

Судорожный припадок при АЭ развивается по стереотипному «сценарию», когда в ответ на включение звука у животного обнаруживается резкое двигательное возбуждение («дикий» или «клонический» бег), сменяющийся клоническими, а затем тоническими судорогами мышц всего тела. Однако на крысах линии КМ (а позднее и на других линиях крыс с АЭ), еще в середине XX века было показано, что после серии из 15-18 ежедневных экспозиций животного действию сильного звука, у них появляются судорожные феномены иного типа – короткие «тикообразные» подергивания лицевых мышц и мышц передних конечностей. Их наблюдали после окончания тонической фазы судорог АЭ или в период «тормозной» фазы, иногда обнаруживающейся в фазе «клонического» бега. И если при генерализованном судорожном припадке АЭ в ЭЭГ коры и гиппокампа не обнаруживаются характерных для эпилепсии «знаков», то миоклонические подергивания сопровождаются четко выраженными (особенно в гиппокампе) разрядами «пик-волна», характерными для судорожных феноменов в мозге. Важно отметить, что эти особенности развития судорог с локализацией в переднем мозге описаны и для других линий крыс с АЭ. В целом общая динамика процессов, конечным выражением которых является постепенное появление эпилептических феноменов уже в переднем мозге, - процесс сложный и не поддающийся, на сегодня, полному описанию. Этот процесс постепенного формирования судорожной активности в переднем мозге называется английским термином *kindling* (зажигание), удачным аналогом которого является русское слово «раскачка». Киндлинг как *постепенное* проявление эпилептической активности был сначала описан как появление судорожной активности в ходе серии слабых подпороговых электрических импульсов, подаваемых на структуры лимбической системы животного. Затем была продемонстрирована сходная картина при введении малых доз веществ, вызывающих судороги. Однако «аудиогенный» киндлинг занимает особое место в ряду этих методических приемов, поскольку он не связан с возможными побочными действиями конвульсантов или электротока.

Следует отметить, что развитие судорог в переднем мозге, т.е. феномен киндлинга, достаточно обоснованно считается лабораторной моделью так называемой «височной эпилепсии» человека. Однако судорожная активность в переднем мозге грызунов, как следствие многократных судорожных припадков, является сильно упрощенным воспроизведением височной формы эпилепсии человека, и говорить об этих явлениях, как о «височной эпилепсии крыс» (как это написано в диссертации А.А. Куликова) представляется не достаточно обоснованным.

Именно последствия многократных судорожных припадков АЭ, как экспериментальный подход, был выбран диссертантом для оценки цитологических и молекулярно-генетических процессов, которые происходят в структурах гиппокампа в ходе ежедневной провокации судорожных припадков АЭ. Следует отметить, что в категорию «лимбических» судорог автор относит не только миоклонические судорожные явления (о которых говорилось выше), но и так называемый «пост-тонический клонус», а описание собственно миоклонических судорог автором не проводится. Однако фундаментально важные данные по возрастной динамике этих явлений достаточно важны, а феноменологические особенности пост-тонических судорожных состояний, видимо, следовало бы в дальнейшем описать более подробно.

Автор получил новые данные по динамике активности ERK1/2 киназ, по повышенной аберрантной миграции вновь образованных клеток, по разрастанию мшистых волокон (важной проекционной системы внутри гиппокампа), по увеличению плотности синаптических контактов, обусловленных нарастанием содержания синаптоподина. Эти сведения подробно и профессионально четко представлены в диссертации.

Объем экспериментальной работы, проведенной автором диссертации, очень велик, поэтому нижеследующее замечание является, в значительной степени дискуссионным, но может рассматриваться как «заявка» на необходимость более полного описания феноменологии АЭ в целом и

феномена аудиогенного киндлинга, в частности. Речь идет о том, что крысы аутбредной линии Вистар, которая была исходной для селекции линии КМ (и линии WAR в Бразилии) обнаруживают невысокой интенсивности АЭ в небольшом проценте случаев. Было бы правильно получить данные о предрасположенности к АЭ в популяции крыс Вистар, использованной в качестве контроля. Очевидно, что для первой серии экспериментов с «наивными» крысами невозможно было оценить АЭ крыс Вистар, но можно оценить возможные изменения в нейрохимических и нейроморфологических признаках, если подвергать крыс Вистар такому же звуковому воздействию, как и крыс КМ (поскольку само по себе действие сильного звука может быть причиной каких-то нейрохимических сдвигов).

Важно отметить, что автор провел исследование и подробно описал результаты анализа процесса клеточной пролиферации в нижних буграх четверохолмия, т.е. в структуре, которая в норме не является нейрогенной областью. Были также проведены эксперименты по оценке у крыс КМ особенностей системы апоптотической гибели клеток, активируемой р53-зависимым и митохондриальным путями. Эти данные – новый и интересный факт, важный для получения полной картины процессов генеза судорожных состояний при АЭ. В работе проанализирован и процесс аутофагии, что в описании патофизиологии АЭ грызунов является практически новым словом. Данные описаны подробно, проведена статистическая обработка полученных результатов.

Из недочетов работы следует отметить злоупотребление автора использованием выражения «височная эпилепсия», о чем было сказано выше, а также использование им выражения «аудиогенно-чувствительные крысы», которое нелогично и имеет черты лабораторного жаргона. Кроме того, хотя автор и оценивает важность термина «киндлинг», как описывающего феномен развития «передне-мозговых» судорог в ответ на звук, но использует этот термин и для описания процедуры собственно многократной экспозиции животного действию звука, что представляется некорректным.

Разумеется, приведенные замечания не снижают высокого качества диссертационной работы А.А. Куликова.

Заключение

Диссертация Куликова Алексея Андреевича на тему: «Механизмы структурной реорганизации гиппокампа и нижних бугров четверохолмия при эпилептогенезе у крыс линии Крушинского-Молодкиной» является завершенной научно-квалификационной работой, вносит существенный вклад в науку и практику. По объему изложенного материала, новизне, значимости для науки и практики работа Куликова А.А. полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней ВАК Минобрнауки Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, предъявляемым к кандидатским диссертациям», а ее автор, Куликов Алексей Андреевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. Физиология человека и животных.

Диссертация, автореферат и отзыв рассмотрены и одобрены на заседании кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (протокол № 9 от 3 июля 2023 года).

Ведущий научный сотрудник кафедры высшей нервной деятельности Биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова,
доктор биологических наук

Полетаева Инга Игоревна.

08.08.2023



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М.В. Ломоносова). Адрес организации: Москва, 119991, Ленинские горы, д.1. email: info@rector.msu.ru, сайт: <http://msu.ru>