

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

доктора биологических наук Ветрового Олега Васильевича  
на диссертационную работу Коваленко Анны Андреевны «Изменение экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс при эпилептогенезе»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных

### **Актуальность темы выполненной работы**

Диссертационная работа А.А. Коваленко посвящена сравнительному анализу динамики экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс в моделях острых судорог и эпилепсии. Судорожные приступы и эпилепсия представляют собой весьма распространённый фактор снижения качества жизни населения. Существенная доля заболеваний эпилепсией не имеет наследственную природу. На сегодняшний день совершенно очевидна недостаточность понимания механизмов развития заболеваний данной группы и, как следствие, нехватка знаний для разработки эффективных терапевтических подходов. Проведенные диссертантом исследования, направленные на изучение модификации экспрессии рецепторного звена глутаматергической медиаторной системы, происходящей в процессе эпилептогенеза и приводящей к дальнейшему прогрессированию судорог, частично решают эту проблему. По результатам проведенной работы Анна Андреевна убедительно показала, что изменения экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата более выражены в литий-пилокарпиновой модели, чем в пентилентетразоловой, и выявила ключевые изменения, которые могут вносить вклад в эпилептогенез.

### **Структура и содержание работы**

Структура диссертации А.А. Коваленко соответствует традиционным стандартам и рекомендациям ВАК. Рукопись включает разделы «введение», «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты», «обсуждение», «выводы», «заключение», «список сокращений», «список использованной литературы». Объем рукописи составляет 129 страниц, она проиллюстрирована 42 рисунками, 7 таблицами и 3 приложениями. Список литературы включает 250 источников, большая часть которых англоязычные.

Изложение материала выполнено четким и ясным языком, выверенным по стилю и логике изложения. При прочтении «введения» и «литературного обзора» формируется представление о современном уровне разработанности темы и существующих пробелах. В разделе «материалы и методы» дается подробное описание использованных методов, что указывает на глубокое понимание диссертантом базовых принципов и технологических особенностей использованной методологии. В разделе «результаты» последовательность изложения экспериментальных данных логична, описание результатов не вызывает

вопросов и замечаний, иллюстративный материал информативен и достаточен, а в «обсуждении» проведено детальное осмысление полученных результатов и их места в современной науке, а также представлены удобные таблицы, суммирующие основные результаты. Выводы обоснованы, отражают полную реализацию цели и задач, завершенность исследования в целом. В «заключении» кратко резюмированы итоги проделанной работы.

### **Научная новизна и теоретическая значимость**

В диссертационном исследовании Коваленко А.А. впервые проведен детальный анализ продукции мРНК и белковой экспрессии основных типов метаботропных и ионотропных рецепторов глутамата в различных структурах мозга крыс (височной коре, дорзальном и вентральном гиппокампе) с использованием физиологически адекватных моделей эпилепсии и острых судорог. Выявлены регион-специфичные сходства и различия в изменениях экспрессии генов рецепторов глутамата между литий-пилокарпиновой моделью эпилепсии и острыми судорогами. Полученные диссертантом результаты представляют особую ценность для мирового нейрофизиологического сообщества во многом благодаря одновременному сравнению экспрессии исследуемых генов сразу в двух экспериментальных моделях, что способствует выявлению ключевых различий в патогенезе, но особенно ввиду детальной проработки подхода к нормировке данных. А именно был осуществлен предварительный анализ стабильности экспрессии множества генов домашнего хозяйства в исследуемых структурах мозга в применяемых физиологических моделях и выбраны оптимальные группы генов для нормализации данных в каждом отдельном случае. Высокое внимание к выбору контролей и детальная проработка дизайна исследований определили значимость полученных диссертантом результатов для фундаментальной науки.

### **Практическая значимость**

Полученные А.А. Коваленко результаты, наряду с новизной и теоретической ценностью, имеют несомненную практическую значимость, поскольку детальное понимание изменений в ансамбле рецепторов глутамата, происходящих во время эпилептогенеза, может быть использовано при разработке новых методов как для лечения эпилепсии, так и для превентивной терапии данной группы заболеваний. Кроме того, разработанные в процессе диссертационного исследования мультиплексные тест-системы могут быть внедрены для широкого применения, способствуя как повышению качества исследований, так и экономии расходных материалов.

Сведения, почерпнутые оппонентом при ознакомлении с результатами диссертационного исследования, представляются интересными для включения в программу курсов лекций по биохимии патологий мозга.

### **Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации**

Экспериментальные данные, приведенные в диссертации А.А. Коваленко, получены на достаточной выборке животных и с применением подходящих для решения поставленных задач методов исследования, грамотно статистически обработаны с использованием адекватных статистических методов. На основании полученных данных сделано 4 вывода. Выводы соответствуют полученным результатам. При детальном знакомстве с рукописью достоверность представленных в работе материалов не вызывает сомнений. Основные положения диссертации широко апробированы, будучи представленными на 12 конференциях российского и международного уровня, и опубликованы в 9 статьях в рецензируемых отечественных и международных журналах.

### **Замечания**

1. По тем же причинам, по которым автором была предпринята большая и крайне ценная работа по оптимизации подбора референсных генов для ПЦР, переход от использования референсных белков к анализу всего белка, перенесенного на мембрану, имеет высокую ценность. Однако, в связи с этим у оппонента 2 замечания:
  - А) краситель Ронсеау обладает низкой чувствительностью к белку, в связи с чем куда более предпочтительны другие красители. Например, краситель Amido Black или технология Stain Free, позволяющий получать куда более точные данные по концентрации белка.
  - Б) Угол наклона кривой зависимости сигнала от концентрации различных белков при хемилюминесцентной детекции и при колориметрической детекции общего белка различаются. В связи с этим для повышения качества данных, получаемых методом вестерн блот, в будущем имеет смысл в каждом отдельном случае строить калибровочные кривые, и только после этого проводить нормировку на белки домашнего хозяйства или общий белок.
2. В диссертационном исследовании для выделения белка использован протокол тотальной экстракции. Хорошо известно, что эффективность рецепции глутамата может регулироваться не только изменением количества и соотношения различных белков, но также и процессами депонирования и экспонирования. В связи с этим в

будущих исследованиях диссертанту может оказаться полезным переход от исследования суммарного количества глутаматных рецепторов к субклеточному фракционированию и оценке их распределения между клеточной мембраной и внутриклеточными компартментами.

3. Также фундаментальная ценность исследований в данной области может быть существенно увеличена при сопоставлении выявленных или не выявленных изменений экспрессии тех или иных типов рецепторов глутамата в используемых диссертантом моделях с результатами функциональных тестов с применением электрофизиологических методов.

### **Заключение**

Диссертационная работа Коваленко Анны Андреевны «Изменение экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс при эпилептогенезе», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных, является законченной научно-квалификационной работой, в которой автором сформулированы и обоснованы научные положения, имеющие существенное значение для развития физиологии. Полученные результаты достоверны, выводы обоснованы. Автореферат верно отражает содержание диссертации. Принимая во внимание актуальность выполненной работы, ее объем, обоснованность и научную новизну сделанных обобщений и выводов, можно заключить, что диссертация «Изменение экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс при эпилептогенезе» отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям, а ее автор Коваленко Анна Андреевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5. – Физиология человека и животных.

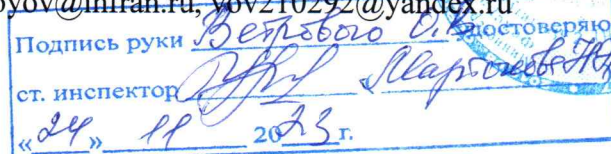
Ведущий научный сотрудник  
Лаборатории регуляции функций нейронов мозга  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института физиологии им. И.П. Павлова РАН  
доктор биологических наук

24.11.2023

Ветровой Олег Васильевич

Адрес: 199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6.

Тел. + 7 (952) 240-24-94, e-mail: [vetrovoyov@infran.ru](mailto:vetrovoyov@infran.ru), [yov210292@yandex.ru](mailto:yov210292@yandex.ru)



О.В. Ветровой