

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Коваленко Анны Андреевны  
«ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ И МЕТАБОТРОПНЫХ  
РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗЕ»,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.5 – Физиология человека и животных

Несмотря на то, что эпилепсия относится к числу наиболее распространенных неврологических заболеваний, а изучение её патогенеза длится уже многие годы, до сих пор причины возникновения судорожной активности, как и молекулярные механизмы формирования эпилепсии остаются не до конца выясненными. Особенно много нерешенных вопросов относится к приобретенным, спонтанно возникающим случаям этого заболевания.

В настоящее время считается, что основным фактором (причиной) развития судорожных состояний служит дисбаланс между тормозными и возбуждающими системами в структурах мозга, возникающий из-за ослабления ГАМК-ергической трансмиссии, либо из-за избыточной активации основной возбуждающей нейромедиаторной системы мозга – глутаматергической. Изучению причин и механизмов развития такого дисбаланса посвящены многочисленные работы, но, тем не менее, многие детали до сих пор не ясны и требуют дальнейших углубленных исследований. Именно поэтому тема диссертационной работы А.А.Коваленко, направленной на анализ изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в структурах мозга крыс в моделях острых судорог и на разных стадиях формирования эпилепсии, несомненно, актуальна и интересна.

Диссертация А.А.Коваленко построена по стандартному плану. Во «Введении» приведены краткие сведения о состоянии проблемы на сегодняшний день, обоснованы цель и задачи исследования, а также перечислены основные результаты работы, отмечена их новизна и значимость.

В «Обзоре литературы» диссертант дала краткую характеристику эпилепсии и рассмотрела разные приемы моделирования острых судорог и эпилепсии, используемые в настоящее время в экспериментальной практике. Основная часть этого раздела диссертации посвящена детальному описанию строения и основных функций глутаматных рецепторов – как ионотропных (iGluRs), так и метаботропных (mGluRs). Автор привела современные сведения о субъединичном составе и особенностях взаимодействия субъединиц при формировании ионных каналов NMDA- и AMPA-рецепторов глутамата. Подробно рассмотрены имеющиеся в литературе данные об основных представителях метаботропных рецепторов глутамата. Причем диссертант подчеркнула, что mGluRs, благодаря своей локализации (на пост- или пре-синаптических мембранах, а также на мембранах астроцитов), в отличие от iGluRs, способны модулировать синаптическую передачу. В заключительном разделе литературного обзора А.А.Коваленко критически проанализировала накопленные к настоящему времени сведения о возможной роли ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в эпилептогенезе, обратив внимание читателей на малочисленность и некоторую противоречивость данных, особенно в отношении mGluRs. Таким образом, обзор литературы аргументировано подтверждает актуальность выбранной диссертантом темы исследования, обосновывая цель и задачи работы.

Обзор написан хорошим литературным языком, иллюстрирован 11 рисунками и основан на анализе большого количества публикаций по теме (250 источников), причем значительная часть (около 20%) из них – публикации последних 5 лет.

В методическом разделе диссертации А.А.Коваленко в первую очередь остановилась на детальном описании использованных в работе экспериментальных моделей. Введение животным пентилентетразола (ПТЗ) – антагониста ГАМК<sub>A</sub> рецепторов, выбрано автором для моделирования острого судорожного приступа, а изучение хронического эпилептогенеза А.А.Коваленко проводила на литий-пилокарпиновой модели, которая широко используется многими исследователями. Такой подход позволил диссертанту сопоставить состояние различных рецепторов глутамата при однократных судорожных припадках с тем, что имеет место в хроническую фазу эпилепсии.

С помощью современных молекулярно-биологических методов, адекватных поставленным задачам работы, автором проведена оценка состояния рецепторов глутамата в структурах мозга крыс (дорзальная и вентральная области гиппокампа и височная кора) на 1, 3, 7 и 30 сутки после однократных ПТЗ-индуцированных судорог, а также в латентную и хроническую фазу эпилептогенеза. Относительный уровень белка субъединиц ионотропных рецепторов глутамата определялся методом вестерн-блотинга. Для анализа уровня экспрессии генов, кодирующих субъединицы NMDA- и AMPA-рецепторов, а также экспрессии генов метаботропных рецепторов глутамата применён метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР).

Хорошо известно, что для более точного измерения относительной экспрессии генов методом ОТ-ПЦР необходимо выбрать подходящие референсные гены (гены «домашнего хозяйства») для нормализации получаемых результатов. Однако, необходимо учитывать, что при различных воздействиях экспрессия таких генов может быть нестабильной, что приведёт к получению ложных результатов. А.А.Коваленко очень ответственно отнеслась к выбору и проверке стабильности экспрессии референсных генов для конкретных условий своих экспериментов. Результаты этой большой, кропотливой работы методического характера представлены как самостоятельный раздел (3.1) экспериментальной части диссертации. Автором были разработаны мультиплексные системы для ПЦР в реальном времени с применением флуоресцентно меченых зондов (технология TaqMan) для 9 генов «домашнего хозяйства» (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) и использован новый подход, который заключается в расчете комплексного рейтинга стабильности референсных генов на основе четырех различных алгоритмов с помощью программы RefFinder.

А.А.Коваленко убедительно продемонстрировала, что набор стабильных генов для дорзальной и вентральной областей гиппокампа различен: ген *Rpl13a*, стабильный в дорзальном гиппокампе, проявляет самую низкую стабильность из всех изученных 9 генов в вентральной области гиппокампа. И напротив, самый стабильный для вентрального гиппокампа ген *B2m* является самым нестабильным в дорзальной области гиппокампа. Более того, профили экспрессии референсных генов для каждой

анализируемой области мозга отдельно в латентную (3 и 7 дней) и хроническую (60 дней) фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии (Рис. 3.2, табл.3.1) были различными. Эти результаты ещё раз подчеркивают необходимость тщательного подбора референсных генов и проверки стабильности их экспрессии с учетом исследуемой структуры (ткани) и экспериментальных условий.

Острые судороги, вызванные введением пентилентетразола, приводят к слабо выраженным изменениям экспрессии исследованных генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата. Некоторое снижение экспрессии гена *Grin1* обнаружено только в височной коре крыс на 3 и 7 день (рис. 3.3) и в дорзальной области гиппокампа - ген *Gria2* на 7 день (рис.3.4). Изменений относительного уровня белка субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов ни на одном сроке анализа обнаружено не было (рис.3.5 – 3.11). По мнению автора, эти результаты указывают на то, что ПТЗ-индуцированные судороги не приводят к существенным изменениям субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов. Что касается метаботропных рецепторов глутамата, то диссертантом также не было выявлено существенных изменений в уровне экспрессии их генов после ПТЗ-индуцированных судорог, за исключением гена *Grm1*, экспрессия которого менялась волнообразно: на 3 день после индукции судорог продукция мРНК *Grm1* была повышена, а на 7 сутки снижена (Рис. 3.20).

Интересные новые данные получены А.А.Коваленко при сравнительном анализе состояния различных рецепторов глутамата в латентную и хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. В латентную фазу (период эпилептогенеза, 3 и 7 дни) во всех исследованных структурах мозга крыс продемонстрировано снижение экспрессия генов основных субъединиц ионотропных NMDA- и AMPA-рецепторов (рис. 3.12-3.15), что может указывать на компенсаторный характер этих сдвигов. Изменения продукции мРНК генов I и III групп mGluRs, выявленные в латентную фазу (рис.3.23-3.25), по мнению автора, могут способствовать эпилептогенезу.

В хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели эпилепсии обнаружено, что в вентральной области гиппокампа и височной коре сохранялось обнаруженное в латентную фазу снижение экспрессии генов отдельных субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов (рис.3.23-3.25). Напротив,

характер изменений продукции мРНК metabotropic glutamate receptors отличалось от наблюдаемого в латентную фазу. В частности, в височной коре обнаружено уменьшение экспрессии гена *Grm5* (относится к I группе) (рис.3.26), а изменения экспрессии генов II группы metabotropic glutamate receptors выявляются только в хроническую фазу (рис.3.27). Снижение экспрессии генов *Grm7* и *Grm8* (III группа) которое было обнаружено во всех исследованных областях мозга в латентную фазу (рис.3-25), в хроническую фазу наблюдается в обеих областях гиппокампа для гена *Grm8*; это, по мнению диссертанта, может способствовать эпилептизации мозга.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе А.А.Коваленко нет. В порядке дискуссии хотелось бы получить ответы автора на следующие вопросы:

- 1) В «Обзоре литературы», а также во «Введении», при описании литий-пилокарпиновой модели эпилепсии автор пишет: «После латентного периода, длящегося несколько дней или недель, у животных наблюдаются спонтанные рецидивирующие судороги (хроническая фаза модели)». Но пояснение, чем может быть обусловлена такая большая разница в длительности латентного периода у животных, отсутствует.
- 2) Стр.18 «...в основе нарушения баланса может быть дефицит тормозных процессов, связанный в основном с недостаточной ГАМК-ергической нейротрансмиссией и внеклеточным калиевым током». Что Вы понимаете под выражением «внеклеточный калиевый ток»?
- 3) При описании вариантов пилокарпиновой модели эпилепсии, на наш взгляд, было бы целесообразно сказать несколько слов о различных эффектах ионов лития, а не только о способности лития повышать чувствительность к пилокарпину. Каков биохимический механизм действия ионов лития, приводящий к изменению чувствительности к конвульсанту? И каков механизм действия самого пилокарпина как конвульсанта?
- 4) «Методическая часть», Раздел 2.2. (Рис.2.1-2.2) – схемы эксперимента. Почему выбраны именно такие сроки для оценки биохимических показателей (нет обоснования)? Почему для пентилентетразоловой модели исходно использовали молодых (20-

22 дня) крыс, а для пилокарпиновой модели – взрослых (50-56-дневных) животных?

- 5) Разделы «Результаты» и «Обсуждение результатов» - Раздел 3.2. После пентилентетразоловых судорог в височной коре обнаружено снижение экспрессии гена *Grin1* NMDA-рецепторов на 3 и 7 сутки после введения ПТЗ (рис.3.3.), а в дорзальной области гиппокампа выявлено снижение продукции мРНК *Gria2* через неделю после ПТЗ-индуцированных судорог (рис.3.4). Однако, изменений в количестве белка этих субъединиц не найдено не только через 3 или 7 суток, но и через 30 дней после введения конвульсанта (рис.3.5-3.11). Есть ли у диссертанта какие-либо предположения о причинах такой ситуации?
- 6) Раздел 3.3. Автором установлено снижение экспрессии генов субъединиц NMDA-рецепторов (рис.3.12) как в латентную, так и в хроническую фазу в литий-пилокарпиновой модели, что в ряде случаев сопровождалось снижением относительного уровня белка этих субъединиц (рис.3.14, 3.16+ сводная таблица 4.2). Однако, при обсуждении полученных результатов (стр.89) диссертант приводит имеющиеся в литературе противоположные данные: в пилокарпиновой модели без введения лития в хронической фазе выявлено повышение уровня мРНК *GluN2b* субъединицы в гиппокампе крыс [163]. Можно ли объяснить такое противоречие дополнительными эффектами ионов лития?
- 7) При обсуждении изменения экспрессии генов субъединиц AMPA-рецепторов и относительного уровня их белка диссертант сделала вывод: «Выявленное нами снижение экспрессии данной субъединицы (*GluA2*) позволяет предполагать увеличение доли  $Ca^{2+}$ -проницаемых AMPA-рецепторов, которые способствуют повышенному поступлению ионов  $Ca^{2+}$  в клетку». Согласуется ли такое заключение с тем, что уровень мРНК другой субъединицы этого же рецептора – *GluA1* также снижался в обеих областях гиппокампа и в височной коре (рис.3.13), а в височной коре уменьшался и относительный уровень белка *GluA1* (рис.3.15)?
- 8) В разделе «Обсуждение результатов» (стр.84) в качестве косвенного доказательства участия глутаматергической системы в поддержании судорожных состояний диссертант приводит литературные данные о повышении внеклеточной концентрации глутамата в коре и

гиппокампе крыс после введения ПТЗ [209, 210] и в гиппокампе после судорог, вызванных пилокарпином [72]. Какие механизмы, по мнению диссертанта, могут привести к накоплению глутамата в мозге при судорогах?

Оценивая в целом диссертационную работу А.А.Коваленко, можно отметить:

- обоснованность и логичность выводов и заключений, сделанных диссертантом; это подтверждается большим объёмом проведенных экспериментов, а также привлечением самых современных литературных данных в ходе анализа полученных результатов;
- безусловная достоверность полученных результатов обеспечивается достаточным количеством повторностей при проведении экспериментов и грамотно проведенной статистической обработкой результатов;
- научная новизна диссертационной работы А.А.Коваленко определяется прежде всего тем, что автор впервые сопоставила в одном исследовании характер изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в разных структурах мозга на моделях острых судорог и эпилепсии. Получены приоритетные данные об изменении экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс (дорзальная и вентральная области гиппокампа, височная кора) и доказано, что эти изменения регион-специфичны.

Изменения экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов обнаружены в обеих использованных моделях, но они были более выражены в литий-пилокарпиновой модели и сохранялись до хронической фазы. В то же время продукция мРНК метаботропных рецепторов глутамата практически не меняется при острых судорогах, однако и в латентную, и в хроническую фазы литий-пилокарпиновой модели эпилепсии обнаружены существенные изменения, которые могут вносить вклад в эпилептогенез;

- теоретическая значимость работы А.А.Коваленко в том, что её результаты и основные выводы значительно расширяют существующие представления о вкладе ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в патологические изменения в структурах мозга при эпилептогенезе. Эти новые данные могут быть включены в лекционные курсы по нейрохимии и нейрофизиологии для студентов биологических и медицинских факультетов;

- практическая ценность диссертационного исследования А.А.Коваленко в том, что её результаты могут быть использованы для разработки новых методов лечения эпилепсии, в частности, использование агонистов метаботропных рецепторов III группы в сочетании с другими фармакологическими агентами может быть перспективным подходом к предотвращению развития эпилепсии.

Кроме того диссертантом разработаны мультиплексные тест-системы, использование которых позволяет проводить экспериментальный подбор оптимальных референсных генов для нормализации данных ОТ-ПЦР в образцах тканей/клеточных линий лабораторных крыс при существенной экономии расходных материалов и трудозатрат. Разработаны и оптимизированы мультиплексные системы для анализа экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропных рецепторов глутамата, которые могут применяться другими исследователями при изучении нарушений функционирования глутаматергической системы.

- диссертационную работу А.А.Коваленко можно считать завершенным (в рамках поставленных задач) научным исследованием.

Материалы диссертационной работы А.А.Коваленко достаточно полно представлены в 9 статьях, опубликованных в престижных рецензируемых российских и зарубежных журналах (входят в списки журналов, рекомендованных ВАК) и неоднократно обсуждались на Всероссийских и международных конференциях и съездах.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация КОВАЛЕНКО Анны Андреевны «Изменение экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс при эпилептогенезе», представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему, в которой получены новые научные результаты, имеющие как теоретическое, так и практическое значение. По своей актуальности, форме, объёму исследований, обоснованности положений, выносимых на защиту, новизне полученных данных, их научной и практической значимости диссертация соответствует



