

Утверждаю

Директор Института высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии РАН

проф. РАН А.Ю. Малышев



ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН на диссертационную работу КОВАЛЕНКО Анны Андреевны на тему: «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 (биологические науки).

Актуальность темы диссертационной работы

Эпилепсия – хроническое неинфекционное заболевание головного мозга, которым страдают около 50 миллионов человек во всем мире. Оно характеризуется повторяющимися судорожными припадками, представляющими собой краткие эпизоды произвольных движений, которые могут быть парциальными или генерализованными и иногда сопровождаются потерей сознания и контроля над функцией кишечника или мочевого пузыря. Значительная часть случаев заболевания эпилепсией является приобретенной, в связи с чем предотвращение развития данного заболевания у пациентов из группы риска является важной медицинской проблемой. На долю эпилепсии приходится более 0,5% глобального бремени болезней, что имеет значительные экономические последствия с точки зрения потребностей в медицинской помощи, преждевременной смерти и снижения производительности труда. Сложность лечения эпилепсии связана с разнообразием патогенетических механизмов, которые не до конца изучены, а разработанные способы профилактики эпилепсии не являются высокоэффективными.

Широко распространенная гипотеза развития гипервозбудимости нейронов при эпилепсии связывает это изменение состояния клеток с нарушением баланса между

тормозными и возбуждающими системами в различных отделах головного мозга. Основной возбуждающей нейромедиаторной системой мозга является глутаматергическая, и именно изучению ее рецепторов посвящена настоящая диссертация. Изменения экспрессии ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в процессе эпилептогенеза остаются малоизученными. Особенно стоит отметить важность изучения изменений, происходящих с метаботропными глутаматными рецепторами, так как они модулируют и возбуждающую, и тормозную синаптическую передачу, и применение их лигандов может быть перспективным подходом к лечению и предотвращению развития эпилепсии. В связи с этим, исследование А.А. Коваленко, посвященное изучению экспрессии генов как ионотропных, так и метаботропных рецепторов глутамата в различных областях мозга крыс после острых судорог и в модели хронического эпилептогенеза, является актуальным и представляет интерес с научной и практической точки зрения.

Научная новизна работы

Автором впервые проведен комплексный анализ изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата на моделях острых судорог и эпилепсии. Впервые для использованных моделей был проведен подбор стабильно экспрессирующихся референсных генов из ряда общепринятых генов домашнего хозяйства (*Actb*, *Gapdh*, *B2m*, *Rpl13a*, *Sdha*, *Ppia*, *Hprt1*, *Pgk1*, *Ywhaz*) в височной коре, дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс, и было показано, что показатели стабильности экспрессии референсных генов различаются для этих двух моделей, а также являются регионспецифичными. Для литий-пилокарпиновой модели анализ проводился в латентную (когда судороги не проявляются) и хроническую (для которой характерно развитие спонтанных рецидивирующих судорог) фазы отдельно.

В ходе проведенного исследования автором были обнаружены изменения экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в двух использованных моделях, однако они были более выражены в модели хронических судорог и сохранялись до хронической фазы. При этом впервые показано, что экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата практически не меняется при острых судорогах, в то время как в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии и в латентную, и в хроническую фазы выявлены существенные изменения, которые могут вносить вклад в эпилептогенез.

В целом, результаты работы углубляют понимание патологических изменений, происходящих в глутаматергической системе мозга, в процессе эпилептогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты, полученные в ходе проведенного исследования, существенно расширяют представления о механизме эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели височной эпилепсии и, в дальнейшем, могут быть использованы при разработке новых методов лечения эпилепсии.

Несомненную практическую значимость представляют разработанные в ходе исследования мультиплексные тест-системы для генов домашнего хозяйства и для генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата. Использование этих систем 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.

Результаты работы могут быть также использованы в качестве учебного материала в процессе преподавания курсов нормальной физиологии и патофизиологии в ВУЗах, а также в ходе профессиональной переподготовки врачей в ИУВ.

Степень обоснованности научных положений и выводов

Сформулированные автором положения, выносимые на защиту, и выводы соответствуют данным, представленным в работе. Для решения поставленных задач были использованы подходящие современные методические подходы. В работе в целом применялись адекватные статистические методы. По теме диссертационного исследования Коваленко Анной Андреевной опубликована 21 работа, в том числе 9 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций.

Структура и оформление работы

Диссертация А.А. Коваленко построена по общепринятому плану и состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, описание собственных результатов, обсуждение, выводы, заключение, список сокращений, список литературы, включающий 250 источников, приложение. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, включает 42 рисунка и 7 таблиц. Основные положения диссертации полностью отражены в 21 публикации, в том числе в 9 статьях в журналах списка ВАК. Материалы были широко представлены автором на конференциях и съездах различного уровня. Диссертационная работа в целом хорошо оформлена и отредактирована.

Во введении автор приводит краткие сведения об актуальности выбранной темы и состоянии исследуемой проблемы на сегодняшний день, обосновывая тем самым цель и

задачи исследования, а также перечисляет основные результаты работы, отметив их новизну и значимость.

Обзор данных литературы занимает 26 страниц. Обзор начинается с краткой характеристики эпилепсии и судорожных состояний. Далее Коваленко А.А. рассматривает основные подходы к моделированию эпилепсии у животных, прежде всего заостряя внимание на моделировании острых судорожных состояний с помощью пентилентетразола и моделировании эпилепсии пилокарпином. В последующих разделах обзора соискательница анализирует широкий спектр данных, касающихся роли глутаматных рецепторов в эпилептогенезе. Она приводит современную классификацию рецепторов, даёт подробную характеристику ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата, показывает зависимость их функции от субъединичного состава, а также анализирует известные данные по их участию в патогенезе эпилепсии. На основе анализа литературных данных автор приходит к выводу о том, что как iGluRs, так и mGluRs могут участвовать в формировании судорог и вносить вклад в эпилептогенез. Тем не менее она отмечает, что изменения экспрессии генов, кодирующих iGluRs и mGluRs, а также их роль в эпилептогенезе до настоящего времени остаются малоизученными, что ограничивает применение лигандов этих рецепторов в клинической практике. Именно это позволило Коваленко А.А. сформулировать цель исследования как анализ изменений экспрессии генов, кодирующих iGluRs и mGluRs, после острых индуцированных пентилентетразолом судорог и на разных стадиях эпилептогенеза в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии.

Для достижения указанной цели автором были сформулированы несколько задач. В качестве первой задачи была выдвинута важная методическая задача, а именно: разработка мультиплексной тест-системы для быстрого анализа экспрессии генов домашнего хозяйства в тканях крыс с оценкой стабильности экспрессии этих генов в различных областях мозга в модели судорог, вызванных пентилентетразолом, а также в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Другими задачами работы стали описание динамики изменений экспрессии генов ионотропных (на уровнях мРНК и белка) и метаботропных (на уровне мРНК) глутаматных рецепторов в дорзальной и вентральной областях гиппокампа, а также височной коре мозга крыс после острых судорог, индуцированных пентилентетразолом, анализ изменений экспрессии генов ионотропных (на уровнях мРНК и белка) и метаботропных (на уровне мРНК) глутаматных рецепторов в разных областях мозга крыс с эпилепсией, индуцированной введением лития и пилокарпина, на этапе эпилептогенеза в латентную фазу и в хроническую фазу у животных с выраженными спонтанными рецидивирующими судорогами.

Для проведения этого исследования Коваленко А.А. использовала комплексный подход, основанный на использовании физиологических, биохимических и молекулярно-биологических методов. В главе «Материалы и методы», автор приводит описание объекта исследования, используемых экспериментальных моделей (пентилентетразоловой модели острых судорог и литий-пилокарпиновой модели эпилепсии) и аналитических методик. Автор использует две модели эпилепсии, отличающиеся по генезу судорожной активности. В первой модели судороги вызываются блокатором бензодиазепинового сайта ГАМК_A-рецептора пентилентетразола, во второй - агонистом м-холинорецепторов пилокарпином. В качестве основной мишени, исследованию изменений которой и посвящена диссертация, были использованы ионотропные и метаботропные рецепторы глутамата. В разделе приведены протоколы проведенных экспериментов, снабженные графическими схемами. Далее автор приводит подробное описание протоколов изучения экспрессии генов, кодирующих глутаматные рецепторы. В таблицах представлены последовательности праймеров, использованных для проведения ПЦР. Отличительной особенностью методического подхода является использование мультиплексной оценки содержания транскриптов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов, а также метаботропных рецепторов глутамата в ткани мозга. Более того, автором проведена разработка нового мультиплексного набора генов домашнего хозяйства, которые часто используются в качестве референсных для нормализации экспрессии генов у крыс. В частности, разработаны мультиплексные тест-системы, которые позволяют анализировать экспрессию 9 референсных генов в 3 реакциях. Разработка новых подходов и модификация имеющихся методов исследования – один из важнейших аспектов научных исследований. Поэтому подбор нового мультиплекса референсных генов для дифференцированной оценки содержания транскриптов генов, кодирующих ионотропные и метаботропные рецепторы в мозге, является безусловной заслугой А.А. Коваленко. К сожалению, в методической части (раздел 2.1) отсутствуют сведения об утверждении протокола работы с животными Комитетом по этике Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН, хотя и имеется упоминание о соответствии проведенных экспериментов рекомендованным правилам.

Третий раздел диссертации содержит пять небольших по размеру глав результатов собственных исследований. Первая глава посвящена разработанной автором мультиплексной панели для оценки генов домашнего хозяйства в разных отделах мозга крыс в двух моделях судорог. Это важный раздел диссертации, который обосновывает необходимость дифференциального подхода к исследованию процессов экспрессии генов в разных моделях патологий у животных. В проведенной серии экспериментов автор

продемонстрировала, что для разных этапов развития эпилепсии, а также для острых и хронических моделей судорог необходимо использовать разные наборы референсных генов, сохраняющих стабильный уровень экспрессии, несмотря на изменение количественного и качественного состава клеточной популяции в уязвимых в отношении судорог отделах мозга.

Следующая глава посвящена изучению изменений экспрессии мРНК генов, кодирующих ионотропные и метаботропные рецепторы глутамата в модели острых судорог. Соискательница обнаружила волнообразные и краткосрочные изменения экспрессии гена Grm1 I группы метаботропных рецепторов глутамата в височной коре и снижение экспрессии генов субъединиц GluN1 NMDA-рецепторов в височной коре и GluA2 AMPA-рецепторов в дорзальной области гиппокампа выявлено на уровне мРНК, но не белка.

В последующих главах автор приводит результаты исследований, проведенных на литий-пилокарпиновой модели эпилепсии в латентную фазу и при выраженных судорогах. Автор отмечает, что изменения экспрессии генов в этой модели эпилепсии носили более выраженный характер. В период эпилептогенеза (латентная фаза модели) экспрессия генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата снижалась и на уровне мРНК, и на уровне белка во всех исследованных структурах мозга. Экспрессия генов метаботропных рецепторов глутамата III группы была понижена, а изменения продукции мРНК различных представителей метаботропных рецепторов I группы (Grm1 и Grm5) в вентральном гиппокампе носили разнонаправленный характер. На хронической стадии, соответствующей сформировавшейся височной эпилепсии, продукция мРНК и белка субъединиц ионотропных рецепторов GluN2b и GluA2 оставалась пониженной в височной коре и в вентральном, но не дорзальном, гиппокампе. При этом, сохранялось снижение экспрессии генов Grm1 (I группа) и Grm8 (III группа), и появлялись разнонаправленные изменения экспрессии генов рецепторов II группы: Grm2 (повышение) и Grm3 (понижение).

В главе «Обсуждение» А.А. Коваленко представляет краткую характеристику работы, сопоставляет результаты собственных исследований с данными других авторов, а также подводит итоги проделанной работы. Следует еще раз отметить, что большинство представленных в этой работе данных получены впервые. В одном исследовании в ходе работы над диссертацией проведен комплексный анализ изменений экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата на моделях острых судорог и эпилепсии. Обнаруженные в модели острых судорог изменения экспрессии генов рецепторов глутамата выражены значительно слабее, чем в литий-пилокарпиновой

модели. Работа демонстрирует, что существенные изменения, выявленные в латентную фазу литий-пилокарпиновой модели, могут вносить вклад в эпилептогенез.

ЗАМЕЧАНИЯ И ВОПРОСЫ К РАБОТЕ. Выводы полностью отражают результаты работы и соответствуют цели исследования и полученным результатам. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационного исследования. В то же время представляется, что формулировка положения 1 по сути является результатом методической разработки, которая, имея существенное значения для многих исследователей с практической точки зрения, вряд ли заслуживает отдельной защиты в качестве наиболее общего положения.

Кроме того возникло еще несколько вопросов, на которые не удалось найти ответа в тексте представленной диссертации, и замечаний. В частности, почему для моделирования острых судорог были использованы ювенильные особи, и будут ли обнаруженные изменения характерны для взрослых животных? В методическом разделе и далее по тексту практически нет информации о количественном составе исследованных групп, а подписи к рисункам содержат объединенные данные, по которым трудно судить о числе крыс в группах. Для поздних стадий развития эпилепсии в литий-пилокарпиновой модели характерно развитие склероза гиппокампа, что значительным образом влияет на количественный и качественный состав клеток в этом отделе мозга. В связи с этим хотелось бы понимать, к каким типам клеток относятся обнаруженные автором изменения экспрессии генов глутаматных рецепторов? Как, по мнению автора, можно было бы учесть это при организации и проведении конкретных экспериментов? Сделанные замечания и заданные вопросы не снижают значимости и ценности полученных Коваленко А.А. результатов.

Заключение

В ходе выполнения диссертационного исследования Коваленко Анна Андреевна продемонстрировала навыки квалифицированного исследователя, способного использовать имеющиеся и разрабатывать новые методы исследования в области физиологии и решила важную с точки зрения фундаментальной и прикладной науки задачу анализа экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов в структурах мозга крысы при острых судорогах и развитии эпилепсии. Диссертация Коваленко Анны Андреевны на тему: «Изменение экспрессии генов ионотропных и метаботропных рецепторов глутамата в мозге крыс при эпилептогенезе» является завершенной научно-квалификационной работой и вносит существенный вклад в науку и практику. По объему изложенного материала, новизне, значимости для науки и практики работа Коваленко А.А. полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых

степеней ВАК Минобрнауки Российской Федерации № 842 от 24.09.2013, (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., № 426 от 20.03.2021 г., № 1539 от 11.09.2021 г., № 1690 от 26.09.2022 г., № 101 от 26.01.2023 г.), а ее автор Коваленко Анна Андреевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 Физиология человека и животных (биологические науки).

Отзыв составлен ведущим научным сотрудником лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института ВНД и НФ РАН М. Ю. Степаничевым. Отзыв обсужден на совместной конференции Лаборатории функциональной биохимии нервной системы, Лаборатории молекулярной нейробиологии и Лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории функциональной
биохимии нервной системы
ИВНД и НФ РАН
доктор биологических наук


Подпись Степаничев М.Ю.
УДОСТОВЕРЯЮ Степаничев М.Ю.
Зав. канц. ИВНД и НФ Степаничев М.Ю.
/ М.Ю. Степаничев/

mikhail_stepanichev@yahoo.com 8916 505490

Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН: 117485, Москва, ул.
Бутлерова 5А