

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Горбачёвой Евгении Леонидовны на тему: «Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарной системы у крыс линии Крушинского-Молодкиной в процессе эпилептогенеза», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – Физиология.

В диссертации Е.Л. Горбачевой представлен результат большого экспериментального исследования гипоталамо-гипофизарной системы у крыс, предрасположенных к аудиогенной эпилепсии (т.е. к развитию эпилептиформного судорожного припадка в ответ на действие сильного звука). Это исследование проведено на очень высоком методическом уровне, что позволило автору сделать четкие и обоснованные выводы, которые, несомненно, будут востребованы современной наукой, в частности, нейроэндокринологией и нейрогенетикой.

Исследования нейроэндокринологических особенностей эпилепсии, как заболевания мозга человека, разнообразны как по используемым подходам, так и по «знаку» полученных результатов. Это и не удивительно, поскольку данное заболевание многолико и по этиологии, и по вовлечению в патологический процесс разных участков мозга. Однако общие закономерности связи повышенной судорожной готовности с особенностями реакции оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники (ГГНС) и вазопрессинергической системы (ВПС) мозга следует анализировать с использованием, в частности, и генетических моделей эпилепсии.

Моделирование патологических состояний человека, и в частности, судорожных состояний - это важный этап и в выявлении биологических основ заболеваний, и в поиске путей их коррекции (как минимум на уровне проведения доклинических испытаний новых средств коррекции патологии).

Проведенная Е.Л. Горбачевой экспериментальная работа, оформленная как кандидатская диссертация, является логичным, законченным исследованием, которое имеет важное практическое значение и является весьма актуальным, поскольку связано с анализом гормональных сдвигов в ходе развития судорог на модели эпилепсии человека. Важность накопления знаний по этому вопросу, т.е. теоретический аспект диссертации, тем более очевидна, что и сегодня, несмотря на крупные успехи фармакологии, значимый процент случаев эпилепсии человека по-прежнему относится к категории «устойчивых к противосудорожной терапии».

Проведение именно такого анализа и было целью рецензируемой работы. Это определило и конкретные задачи исследования, в число которых входила характеристика нейроэндокринного статуса мозга и надпочечников у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ) как в «фоне», так и при функциональной нагрузке – действии неспецифического стрессогенного фактора (иммобилизации), а также при аудиогенных судорожных припадках. При этом автору следовало проанализировать эти процессы не только как ответ на однократное применение звука, но и после формирования миоклонических судорог («аудиогенного миоклонуса»), т.е. после многократных экспозиций животного действию звука.

Все пункты «Положений, выносимых на защиту» нашли отражение в представленной работе, что свидетельствует о выполнении задач, поставленных перед диссертантом. Полученные в исследовании данные, как и весь подход к проблеме экспериментальной эпилепсии в целом, важны не только как пополнение наших важных теоретически фундаментальных знаний о развитии судорожных феноменов в ЦНС, но и в практическом отношении. О теоретической значимости данных, полученных в настоящей работе, свидетельствуют приоритетные исследования тонких механизмов реакции ГГНС крыс с повышенной судорожной готовностью на действие и «общестрессорного» фактора (иммобилизация), а также специфических изменений, связанных с реакцией крыс линии КМ на звук.

Диссертация построена по традиционному типу – состоит из 4 глав, раздела выводов и списка литературы (276 источников) и содержит 49 иллюстраций. По теме диссертации опубликована 21 работа, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также большое число материалов всероссийских и международных конференций.

Во введении дается краткое описание проблемы, которое является обоснованием конкретных задач исследования.

Обзор литературы, занимающий около 30 страниц, это самостоятельная, важная часть работы. С разной степенью подробности рассмотрены экспериментальные модели эпилепсии. Участие в генезе судорог гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (с четким описанием строения ее отдельных звеньев). Большое внимание автор уделяет и общему описанию вазопрессинергической системы, и ее участию в развитии судорожных состояний с четкими иллюстративными схемами. При этом приводится не только физиологическая литература, но анализируются и нейрохимические и молекулярно-биологические данные. Это изложение, показывающее высокую эрудицию автора, логично демонстрирует важность проведенной работы, поскольку, как следует из диссертации, проанализированы практически неизвестные аспекты феномена генеза рефлекторно вызванных судорог у предрасположенной к аудиогенной эпилепсии линии крыс КМ. Сказанное позволяет заключить, что обзор литературы отвечает самым высоким требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Как уже отмечено, набор методов, использованный в работе, был большим и оказался весьма адекватным для характеристики состояния ГГНС и ВНС у крыс, предрасположенных к развитию судорожных эпилептиформных припадков (в сопоставлении с контрольной группой - крысами Вистар).

В соответствующем разделе работы эти методические подходы описаны с необходимой степенью детализации. Иммуноферментный анализ позволил определить концентрацию гормонов в сыворотке крови, иммуногистохимические методики были использованы для оценки содержания белков, связанных с функцией изучаемых систем, а использование двойного иммуногистохимического окрашивания (для оценки экспрессии фосфо-CREB в кортикотропоцитах передней доли гипофиза) дало возможность глубже проанализировать ряд нейрохимических процессов. Метод гибридизации *in situ* был необходим для исследования особенностей мРНК вазопрессина, а методом вестерн-блота были получены данные по содержанию ряда белков, ключевых для функций исследуемых систем. Кроме этого была измерена оптическая плотность ряда иммунореактивных соединений в перикарионах паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса.

Такая разносторонняя оценка физиологического состояния исследуемых систем и позволила автору получить полноценные научные результаты, оформленные в виде описания данных пяти экспериментов. Это (1) оценка межлинейных различий в функциональном состоянии гормональных систем у крыс линии КМ в сопоставлении с таковым популяции Вистар, (2) описание изменений этих систем при иммобилизационном стрессе, т.е. при состоянии напряжения, не связанном со звуковой стимуляцией, (3) – изменения в функции ГГНС и ВПС после однократного судорожного припадка, вызванного звуком, у крыс КМ и (4) и у крыс Вистар, (5) – изменения данных гормональных систем при аудиогенных припадках, вызванных серийной звуковой стимуляцией.

Автор четко показала, что у крыс линии КМ в фоне понижен уровень гормонов центрального звена ГГНС и ВПС. Затем было проанализировано влияние иммобилизационного стресса на концентрацию гормонов в крови - 30-мин. иммобилизация вызывала повышение концентрации АКТГ и кортикостерона в сыворотке крови у крыс линий Вистар и КМ, однако

достоверных межлинейных различий в этом эксперименте выявлено не было, хотя уровень кортикостерона был значительно выше у КМ.

Однократный вызванный звуком судорожный припадок провоцирует активацию этих систем, причем как в этом, так и в других экспериментах, автор четко проследила динамику этой активации во времени. Эта часть работы (важность которой не очевидна при общем анализе результатов) дала ценную информацию и свидетельствует о хорошей подготовке Е.Л. Горбачевой, как экспериментатора.

Исследование ВСП при аудиогенной эпилепсии, проведенное в работе, носит приоритетный характер. Автору удалось показать, что реализация участия этой системы в условиях эпилептиформного припадка и в процессе восстановления после него происходит по ERK1/2/CREB-зависимому пути. Активация ГГНС носит более длительный характер и сохраняется в течение 24 часов после окончания судорожного припадка, тогда как реакция ВНС – более короткая.

В работе Е. Л. Горбачевой были проанализированы также гормональные механизмы, работающие при аудиогенных судорогах другого типа, так называемых миоклонических судорогах, развивающихся после многократной экспозиции животного действию звука, и имеющих иной, чем клоникотонический припадок, анатомический субстрат. Данный феномен называют также аудиогенным «киндлингом». Этот тип припадка (который можно вызвать и при использовании хемоконвульсантов) считается лабораторной моделью височной эпилепсии человека. Данная форма эпилепсии занимает в эпилептологии особое место и в связи с ее большой распространенностью, и в связи с генезом у таких больных специфических симптомов изменений психики.

Автор показала, что при аудиогенном киндлинге, т.е. после серийных звуковых стимуляции в течение ряда дней, не только повышается активность периферического звена ГГНС, но и усиливается экспрессия вазопрессина, которую сопровождает снижение тормозной функции ГАМК-ергической

системы. Эти новые данные важны для понимания формирования повышенной судорожной готовности мозга и их следует учитывать при работе с другими лабораторными моделями эпилепсии.

Положительными моментами исследования Е.Л. Горбачевой является использование достаточного количества контрольных экспериментальных «процедур». Один из таких экспериментов - это оценка изменений гормонального статуса крыс линии Вистар, которые также, как и крысы КМ, подвергались действию серийной экспозиции звуку, а второй – это наблюдение, показавшее следующее. У нескольких крыс КМ серийное предъявление звука сопровождалось снижением эпилептиформной активности – у них не было реакций на звук в ходе серийных экспозиций его действию. Оказалось, что при этом не было выявлено гормональных изменений подобных тем, которые были у крыс с серийными припадками. Обе эти серии экспериментов свидетельствуют о владении автором логики проведения подобных исследований (с использованием также животных разных генотипов).

Тщательное проведение исследований и логика доказательств наличия изменений при внешних воздействиях у крыс КМ и Вистар, позволили показать, что изменения являются специфичными, а не общими для всех анализируемых процессов. Серьезной и важной частью работы Е.Л. Горбачевой является анализ состояния ГАМК- и глутаматергических «признаков», связанных с развитием судорог.

Разработанная автором на основе проведенного исследования рабочая схема является реальным шагом в демонстрации роли гормональных систем в генезе судорожного состояния.

Данные, полученные в диссертационной работе Е.Л. Горбачевой, которые характеризуют развитие судорог в ответ на звук на основе ряда современных методов, подвергнуты далее тщательному и подробному обсуждению их общебиологического смысла в соответствующем разделе работы (хотя временами это обсуждение повторяет описание исходного материала).

Полученные в работе данные положили начало новому подходу к оценке гормональных процессов в генезе судорожных припадков, и они могут быть началом новых перспективных проектов. Обсуждение полученных данных показывает, во-первых, высокую эрудированность автора, позволяющую анализировать практически все аспекты проблемы, а во-вторых, корректность в интерпретации собственных результатов.

В целом раздел, посвященный обсуждению результатов, полученных в экспериментах, показывает очень четкое владение материалом автором, и он удачно завершает диссертацию.

Таким образом, данные, полученные в диссертационной работе Е.Л. Горбачевой, свидетельствует о хорошей обоснованности работы, что, в свою очередь, определило получение высоко значимых результатов. Обсуждение этих данных показывает, что полученные экспериментальные сведения (и их обоснованная современная трактовка) должны быть использованы и в поиске новых противосудорожных средств, и в теоретических работах, посвященных механизмам эпилептогенеза, и в учебном процессе. Они могут быть использованы как новый материал для спецкурсов по нейрогенетике и нейроэндокринологии патологических процессов, а также при сравнительном анализе информативности использования разных биологических моделей эпилепсии. Это может найти отражение в спецкурсах по нейробиологическим и нейрофизиологическим специальностям в МГУ, СПбГУ, НГУ и ряде других университетов России.

Разумеется, данная диссертационная работа не свободна от недостатков. Одним из замечаний, по нашему мнению, может быть не очень удачное заглавие работы, поскольку термин «эпилептогенез» относится не к развитию конкретного судорожного состояния, а к нейрогенетическим и физиологическим процессам патологического типа, которые формируют повышенную судорожную готовность ЦНС и развитие судорог. Замечанием методического характера является отсутствие упоминаний о развитии (или об отсутствии) специфических миоклонических судорог, развивающихся в

результате многократного действия звука у предрасположенных к аудиогенной эпилепсии животных. Полученные данные показывают развитие нейрогуморальных изменений как результата этой процедуры, однако упоминания о наличии именно миоклонических подергиваний мышц передней части туловища (аудиогенный миоклонус) в работе, к сожалению, нет. Помимо значимого числа опечаток, есть замечания и стилистического характера. Неудачными выражениями можно, например, считать такие, как «наследственные модели эпилепсии», «химические стимуляции» «воздействие острого стресса» и др.

Диссертация Е.Л. Горбачевой представляет собой законченное экспериментальное исследование, в котором получены четкие, достоверные, научно высоко значимые результаты. Диссертация свидетельствует, что автор очень хорошо знакома с научной литературой по выбранной теме, владеет логикой планирования эксперимента, и способна к оценке полученных данных и на уровне межлинейных сравнений, и на основе «показаний» разных использованных в работе методов. Очевидно, что при выполнении работы автор проявила все качества, которые необходимы зрелому исследователю-экспериментатору.

Диссертацию Е.Л. Горбачевой следует квалифицировать как современное исследование, в котором содержатся принципиально новые экспериментальные данные. Основные результаты, полученные в процессе работы над диссертацией, изложены в имеющихся публикациях автора. Автореферат отражает содержание диссертации.

Изложенные выше замечания ни в какой степени не влияют на высокую оценку диссертации, материал которой, на наш взгляд, даже превышает таковой, обычно представляемый в кандидатских диссертациях.

Сказанное позволяет заключить, что диссертационная работа на тему: «Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарной системы у крыс линии Крушинского-Молодкиной в процессе эпилептогенеза», отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (т.е.

критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» от 24.09. 2013 №842), а автор ее Горбачева Евгения Леонидовна, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.03.01 «Физиология».

22.05.2019

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



Полетаева И.И.

Подпись руки ведущего научного сотрудника Полетаевой Инги Игоревны заверяю

Декан Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,
Академик



М.П. Кирпичников

