

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУН ИТ ФМБА России)

На правах рукописи

ОСЕЧКИНА

Наталья Сергеевна

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЯЖЕСТИ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ
НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА

14.03.04 – токсикология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
доцент Г.В. Назаров

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧИЕ ЭФФЕКТОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА НА ОРГАНИЗМ, (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	15
1.1. Основные типы эффектов и поражений, которые возникают при острой и хронической интоксикации.....	15
1.2. Молекулярно-генетические маркеры, определяющие индивидуальные особенности организма при воздействии этанолом	21
1.2.1. ДНК-полиморфизм, гаплотипы и гаплогруппы.....	22
1.2.2. Эпигенетические особенности	31
1.2.3. Количество копий гена	33
1.2.4. Экспрессия генов	34
1.3. Генетические особенности ГАМК-ергической системы, определяющие индивидуальный ответ при действии этанола на организм.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	49
2.1. Животные и их содержание	49
2.2. Характеристика токсического агента.....	50
2.3. Определение токсикометрических параметров этанола.....	50
2.4. Схемы моделирования поражения этанолом	50
2.5. Общая схема проведения исследования	51
2.6. Методы оценки острой токсичности этанолом.....	53
2.7. Методы отбора образцов крови и тканей лабораторных животных	56
2.8. Выделение геномной ДНК из крови лабораторных крыс	57
2.9. Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	58
2.10. Выделение РНК	59
2.10.1. Выделение РНК из тканей крыс	59
2.10.2. Выделение РНК из крови крыс.....	60
2.11. Получение комплементарной ДНК.....	61

2.12. Электрофоретическая детекция комплементарной ДНК.....	61
2.13. Проведение количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.....	62
2.14. Методика оценки относительного уровня экспрессии генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> , <i>Gabra5</i> , <i>Gabra6</i> , <i>Gabrb1</i>	63
2.15. Методы статистической обработки результатов исследований	63
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК _A -РЕЦЕПТОРА, ПРИ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ.....	
3.1. Определение токсикометрического параметра этанола у исследуемых животных.....	65
3.2. Экспериментальная оценка выраженности острого отравления этанолом у животных.....	67
3.3. Изучение влияния острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> , <i>Gabra5</i> , <i>Gabra6</i> и <i>Gabrb1</i> в образцах тканей лабораторных животных	70
3.4. Выявление связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК _A -рецептора, со степенью депримирующего действия этанола	80
3.4.1. Выявление связи уровня экспрессии генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> , <i>Gabra5</i> и <i>Gabrb1</i> со степенью депримирующего действия этанола на модели острой интоксикации этанолом крыс	80
3.4.2. Выявление связи уровня экспрессии генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> , <i>Gabra5</i> и <i>Gabrb1</i> со степенью депримирующего действия этанола на модели острой интоксикации этанолом предварительно алкоголизованных крыс.....	83
ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК _A -РЕЦЕПТОРА, НА ТЯЖЕСТЬ УГНЕТЕНИЯ ЦНС	
	87

4.1. Выявление аллельных вариантов генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> , <i>Gabra5</i> , <i>Gabra6</i> и <i>Gabrb1</i> у белых беспородных крыс для установления их ассоциации с глубиной депримирующего воздействия этанола на нервную систему	87
4.2. Изучение зависимости уровня экспрессии генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> и <i>Gabrb1</i> от генотипа крыс	92
4.3. Влияние полиморфизмов генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> и <i>Gabrb1</i> на степень депримирующего действия этанола при острой интоксикации животных	103
4.3.1. Анализ полиморфизма генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> и <i>Gabrb1</i> на модели острой интоксикации этанолом крыс	104
4.3.2. Анализ полиморфизма генов <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Gabra3</i> , <i>Gabra4</i> и <i>Gabrb1</i> на модели острой интоксикации этанолом предварительно алкоголизованных крыс	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ВЫВОДЫ	132
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	133
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	134
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	140
ПРИЛОЖЕНИЕ А	163

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия наиболее распространенной причиной экзогенных интоксикаций являются нейротропные яды – вещества, которые способны изменять возбудимость и функции центральной нервной системы (ЦНС) [1, 2, 3, 4]. К числу данных агентов относится широкий круг токсичных веществ, таких как наркотики, транквилизаторы, снотворные средства, нейролептики, психостимуляторы, фосфорорганические пестициды и многие другие, включая спирт этиловый и его суррогаты.

Этиловый спирт (в отличие от других психотропных средств), принимая участие в процессах обмена веществ, не является чужеродным для организма субстратом. Однако его употребление как однократное (острое), так и длительное (хроническое) приводит к развитию очень сложных патологических процессов в разных органах и тканях организма. Наиболее разрушительным является вред, наносимый ЦНС. Острая интоксикация этанолом может приводить к развитию таких отклонений как токсическая кома, токсико-гипоксическая энцефалопатия, отек мозга [5, 6, 7]. Кроме того, наличие хронического алкоголизма существенно отягощает метаболические расстройства и нарушения функций ЦНС у больных с острыми отравлениями этанолом [8, 9, 10].

На сегодняшний день среди причин, вызывающих преждевременную смерть людей, острые алкогольные отравления и алкоголизм занимают ведущее место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [11, 12]. Большое количество тяжелых исходов при отравлении этанолом, значительное ухудшение клинических проявлений поражения мозга, сохраняющаяся высокая летальность свидетельствуют о сложности диагностики и прогнозирования степени воздействия этанола на организм. В ряде исследований описывается, что прямые и опосредованные токсические эффекты этанола объясняются его физико-химическими свойствами. Малая диссоциация и слабая поляризация небольших молекул этанола позволяют веществу легко проникать через биологические

мембраны [13, 14]. Помимо поражения плазматических мембран клеток, этиловый спирт оказывает действие на белки клеточных мембран – рецепторы. К числу таких мембранных белков, относится ионотропный ГАМК_A-рецептор – компонент ГАМК-ергической тормозной нейромедиаторной системы. В литературе широко обсуждается существенная роль генетических факторов, в частности уровня экспрессии и полиморфизма генов ГАМК_A-рецептора в формировании толерантности ЦНС к воздействию этанола как у крыс, так и человека [15, 16]. Однако точные механизмы, наследственные факторы зависимости степени тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему от генетических особенностей ГАМК_A-рецептора пока остаются малоизученными и непонятыми. Недостаточное количество информации по данной проблеме, а также ее медико-социальная значимость диктуют необходимость создания лечебно-профилактических мероприятий, учитывающих генетические особенности организма при отравлениях этанолом. Новые подходы к разработке прогностических диагностических маркеров, определяющих глубину депримирующего действия этанола, могут быть связаны с выявлением полиморфизмов генов ГАМК_A-рецептора, а также установлением связи между уровнем их экспрессии и активностью ГАМК_A рецепторного комплекса. Комплексное изучение фенотипа и генотипического профиля организма позволит с высокой степенью вероятности оценить риск развития у него тяжелых форм депримирующего действия этанола, выявить признаки интоксикации на раннем этапе, а также дать предварительный прогноз характера течения отравления. Создание эффективного методического аппарата, включающего в себя учет генетических маркеров, определяющих тяжесть течения интоксикации, существенно повысит точность диагностики состояния отравленных.

Вышеизложенные обстоятельства обуславливают актуальность установления молекулярно-генетических маркеров ГАМК_A-рецептора (полиморфизма генов, кодирующих ГАМК_A-рецептор, и уровня их экспрессии), которые определяют степень тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему организма при интоксикации.

Степень разработанности темы диссертационного исследования. Формирование восприимчивости к депримирующему действию этанола, склонность к развитию алкоголизма зависят не только от дозы, путей поступления алкоголя, но и от генетических факторов – полиморфизмов соответствующих генов и уровня их экспрессии [17]. В некоторых исследованиях показана взаимосвязь полиморфизмов генов ГАМК_A-рецепторов с предрасположенностью к алкогольной зависимости у человека [18]. Достоверные результаты получены для генов, кодирующих α_1 -, α_2 -, α_6 - и γ_2 - субъединицы ГАМК_A-рецептора человека (*GABRA1*, *GABRA2*, *GABRA6*, *GABRG2*). Так, установлено, что генотип G/G по гену *GABRA1* играет важную роль в развитии раннего начала и тяжелого типа алкоголизма [19, 20]. Носители аллеля G (rs279858) по гену *GABRA2* способны медленнее реагировать на воздействие алкоголя и тем самым они более склонны к алкоголизму, чем люди с генотипом A/A [21]. Для полиморфных локусов rs211014 гена *GABRG2* и rs3219151 гена *GABRA6* также была выявлена ассоциация с алкоголизмом [22]. Исследований, связанных с ассоциацией полиморфизмов генов ГАМК_A-рецепторов со степенью тяжести алкогольной интоксикации при отравлении организма этанолом, к настоящему моменту не проводилось.

Дополнительным критерием прогноза исхода интоксикации могут являться показатели экспрессии генов. Так на модели животных был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих соответствующие субъединицы ГАМК_A-рецептора, на фоне однократного и хронического употребления этанола. Для генов, кодирующих α_1 - и α_4 - субъединицы ГАМК_A-рецептора крыс (*Gabra1* и *Gabra4*), было обнаружено, что при многократном воздействии этанола на крыс в коре большого мозга происходит снижение уровня мРНК для α_1 -субъединицы и увеличение уровня мРНК для α_4 -субъединицы [23, 24]. В другой работе показано, что спустя 2 суток с момента окончания хронической алкоголизации крыс в мозжечке определялось повышенное содержание α_6 -субъединицы ГАМК_A-рецептора. При этом, концентрация белка α_6 -субъединицы в мозжечке алкоголизированных крыс

возвращалась к исходному уровню лишь к седьмым суткам после окончания хронической алкоголизации [25, 26]. В отношении связи уровней экспрессии генов, кодирующих ГАМК_A-рецепторы, с тяжестью депримирующего действия этанола у крыс и человека исследований до настоящего времени не проводилось. Таким образом, в литературе представлено достаточное число публикаций, посвященных ассоциации генетических маркеров с развитием алкоголизма. Информация о связи полиморфизмов генов ГАМК_A-рецептора и уровня их экспрессии со степенью угнетения функций ЦНС (после интоксикации этанолом) практически отсутствует. Не изучено возможное использование наследственных особенностей ГАМК_A-рецептора в качестве маркеров, определяющих тяжесть депримирующего действия этанола. Всё указанное позволило сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

Целью настоящего исследования является экспериментальное установление генетических маркеров ГАМК_A-рецептора, которые определяют глубину депримирующего действия этанола, при острой и хронической интоксикации этанолом на моделях лабораторных животных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести анализ научных данных, связанных с изучением генетических особенностей ГАМК_A-рецептора, определяющих различие эффектов воздействия этанола на организм, для выявления перечня генов-кандидатов, влияющих на степень тяжести депримирующего действия этанола.

2. Изучить влияние острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов ГАМК_A-рецептора в образцах тканей экспериментальных животных.

3. Оценить особенности влияния уровня экспрессии генов ГАМК_A-рецептора на степень тяжести депримирующего действия этанола после острой интоксикации крыс без предшествующей алкоголизации и на модели предварительно алкоголизированных крыс.

4. Выявить полиморфные локусы генов ГАМК_A-рецептора, которые могут определять глубину депримации после острого отравления этанолом и изучить их влияние на уровень экспрессии генов ГАМК_A-рецептора.

5. Установить связь между полиморфизмом генов и глубиной тяжести угнетения ЦНС на модели острой интоксикации этанолом крыс и выявить полиморфные маркеры ГАМК_A-рецептора, которые могут быть использованы для определения степени тяжести интоксикации этанолом.

Научная новизна исследования. Исследовано влияние острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов, кодирующих α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_4 -, α_5 -, α_6 - и β_1 -субъединицы ГАМК_A-рецептора крыс (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1*) в различных органах и крови лабораторных животных. Установлено, что острое отравление приводит к увеличению экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* в головном мозге крыс, перенесших острую интоксикацию без предшествующей алкоголизации, и к увеличению уровня экспрессии (УЭ) генов *Gabra5* и *Gabrb1* в головном мозге предварительно алкоголизированных крыс. Показано, что после хронической алкоголизации этанолом происходит достоверное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс. Впервые получены данные о связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Установлено, что утяжеление клиники интоксикации у крыс, перенесших острое отравление этанолом, связано со снижением уровней экспрессии генов *Gabra2* и *Gabrb1*, а у предварительно алкоголизированных крыс – с уменьшением уровня экспрессии гена *Gabra4*.

Выявлено генетическое разнообразие аллельных вариантов для 11 полиморфизмов: *Gabra1* (rs107127945, rs197587817); *Gabra2* (rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638); *Gabrb1* (rs13456854, rs13456852, rs13456851); *Gabra3* (rs105096249); *Gabra4* (rs197596713).

Обнаружено, что полиморфные локусы генов *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabrb1* определяют уровень их экспрессии:

– полиморфизмы rs8168342, rs198286814, rs198837638 гена *Gabra2* и полиморфизмы rs13456854, rs13456852 и rs13456851 гена *Gabrb1* определяют уровень экспрессии гена в головном мозге интактных крыс;

– полиморфизмы rs13456854, rs13456852, rs13456851 гена *Gabrb1* определяют уровень экспрессии гена в головном мозге предварительно алкоголизованных крыс;

– полиморфизмы rs107127945 и rs197587817 гена *Gabra1* определяют уровень экспрессии гена в головном мозге предварительно алкоголизованных животных после острого отравления этанолом.

Впервые установлена ассоциация степени интоксикации крыс, перенесших острое отравление этанолом, с генотипом С/Т по гену *Gabra2* полиморфного локуса rs105733011. Показано, что наличие у крыс гетерозиготного генотипа С/Т по гену *Gabra2* определяет «тяжелую степень интоксикации» спустя 8 часов после острого отравления этанолом.

На модели предварительно алкоголизованных крыс выявлены факторы повышенного риска гибели крыс при отравлении этанолом: генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипы Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4* (спустя 8 часов).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования вносят дополнения в имеющиеся представления о патогенетических изменениях в ГАМК-ергической системе, обусловленных однократным или длительным воздействием этанола, и дают представления о влиянии некоторых молекулярно-генетических особенностей ГАМК_A-рецептора на степень тяжести депримирующего действия токсиканта на нервную систему. Выявленные закономерности изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, под влиянием острого и хронического воздействия этанолом позволили расширить теоретические представления о депримирующем действии токсиканта на ГАМК-ергическую нейромедиаторную систему. Полученные данные о связи уровня экспрессии исследуемых генов со степенью тяжести депримирующего воздействия этанола на нервную систему крыс как на фоне

предварительной алкоголизации, так и без нее свидетельствуют о целесообразности использования наследственных факторов ГАМК_A-рецептора для определения различных отклонений нервной системы, которые возникают при интоксикации этанолом.

Установлено распределение частот генотипов изучаемых полиморфизмов и выявлено влияние некоторых аллельных вариантов на уровень экспрессии соответствующих генов у интактных крыс, а также предварительно алкоголизированных животных на фоне острого отравления этанолом и без него.

Выявленные маркеры ГАМК_A-рецептора, определяющие степень интоксикации крыс, перенесших острое отравление этанолом, и факторы повышенного риска гибели предварительно алкоголизированных крыс при отравлении этанолом используются в практической научно-исследовательской деятельности ФГБУН ИТ ФМБА России при проведении работ по оценке тяжести неврологических нарушений после отравления этанолом, а также внедрены в практику работы лабораторий научно-исследовательских организаций ФМБА России и Министерства обороны РФ.

Методология и методы исследования. Методология исследования состояла в проведении острого алкогольного отравления крыс (на фоне предварительной алкоголизации животных и без нее), с последующим определением состояния животных и установлением возможных молекулярно-генетических маркеров тяжести интоксикации крыс этанолом. С использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили исследование полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1* и определение их уровней экспрессии. С использованием комплекса статистических методик проводили установление ассоциации генотипов животных и уровня экспрессии генов со степенью угнетения функционирования ЦНС, а также определяли динамику изменения уровней экспрессии генов после острой интоксикации крыс. В работе был использован комплекс токсикологических, молекулярно-генетических и аналитических методик лабораторного и инструментального исследования. Применение данных

методик позволило исключить ошибки проведения анализа и с высокой точностью установить распределение интересующих частот генотипов и изучить ассоциацию полиморфизмов генов и уровня их экспрессии со степенью интоксикации белых беспородных крыс.

Положения, выносимые на защиту

1. Острое отравление этанолом приводит к увеличению экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabrb1* и *Gabra5*, *Gabrb1* в головном мозге крыс, перенесших острое отравление этанолом без предшествующей алкоголизации, и предварительно алкоголизованных животных, соответственно, что влияет на степень выраженности депримирующего действия этанола, при этом утяжеление клиники интоксикации связано со снижением уровней экспрессии генов *Gabra2*, *Gabrb1* и *Gabra4* у крыс, перенесших острое отравление этанолом без предшествующей алкоголизации, и предварительно алкоголизованных крыс, соответственно.

2. Полиморфный локус rs105733011 гена *Gabra2* определяет степень интоксикации этанолом спустя 8 часов после отравления крыс в дозе 0,8 ЛД₅₀; полиморфные локусы rs10509624 гена *Gabra3* и rs197596713 гена *Gabra4* определяют повышенный риск гибели предварительно алкоголизованных крыс спустя 3 и 8 часов, соответственно, после отравления этанолом в дозе 0,8 ЛД₅₀.

3. Генотип С/Т (rs105733011) по гену *Gabra2* у крыс, перенесших острое отравление этанолом, а также генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3* и генотипы Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4* у крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации, являются маркерами, которые применимы для определения глубины тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему.

Степень достоверности результатов работы. Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством экспериментальных животных и формированием групп сравнения и контроля; использованием современных высокоинформативных молекулярно-генетических лабораторных

методов исследования; адекватными поведенческими и токсикологическими моделями и методами исследования, применением высокотехнологичного сертифицированного оборудования для изучения генетических особенностей; применением адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Апробация результатов. Результаты проведённых исследований были доложены и обсуждены 11 марта 2019 г. на Ученом Совете ФГБУН ИТ ФМБА России. Материалы были представлены и обсуждены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2013), Научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии» (Санкт-Петербург, 2019). Основные научные результаты диссертации опубликованы в периодических изданиях, в том числе 7 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личный вклад автора. Диссертантом на основе лично проведенного теоретического анализа информации по рассматриваемой теме определена цель и содержание работы, выполнены лабораторно-инструментальные исследования, проанализированы результаты исследования, сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту.

Связь темы диссертации с плановой тематикой научно-исследовательской работы учреждения. Работа выполнена в соответствии с задачами научно-исследовательской работы «Поиск» (тема «Разработка и обоснование методологии клинической, химико-токсикологической, судебно-медицинской диагностики и лечения отравлений веществами депримирующего действия» (клинико-экспериментальное исследование)) в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации».

Структура и объём диссертации. Материалы диссертации изложены на 173 страницах и иллюстрированы 26 таблицами и 31 рисунком. Библиография

содержит 208 источников, из них 100 отечественных и 108 зарубежных авторов. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, а также списка использованных источников литературы и приложения.

Автор выражает искреннюю признательность и глубочайшую благодарность директору ФГБУН ИТ ФМБА России, д.м.н. Иванову М.Б. за техническую поддержку, методологические указания и ценные рекомендации, а также д.м.н. Кашуро В.А. за содействие в проведении работ, связанных с отбором образцов тканей экспериментальных животных.

ГЛАВА 1. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧИЕ ЭФФЕКТОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА НА ОРГАНИЗМ, (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Основные типы эффектов и поражений, которые возникают при острой и хронической интоксикации

Известно, что употребление алкоголя с пищевыми целями может вызывать у человека легкое чувство эйфории, характеризующееся приподнятым настроением и раскованностью. Однако при увеличении дозы этанола и длительности его употребления начинают появляться различные признаки алкогольного отравления.

Множественность токсических эффектов этанола и патологических поражений, развивающихся на фоне употребления алкоголя, объясняется его физико-химическими характеристиками. Так, первичный мембранотропный фармакологический эффект этанола, заключающийся в способности целой молекулы спирта внедряться в липидный бислой, нарушать структуру фосфолипидов и изменять текучесть клеточных мембран, обусловлен его амфифильными свойствами [27, 28]. Кроме того, малая диссоциация и слабая поляризация небольших молекул позволяют этанолу проявлять токсический эффект не только на субклеточном, но и клеточном, тканевом, а также органном уровнях, вызывая множество различных типов поражений практически всех систем организма (таблица 1) [7, 29, 30, 31, 32].

Таблица 1 – Основные типы поражений систем организма, которые развиваются вследствие токсических эффектов этанола

Основные типы поражений	Механизмы поражений
Пищеварительная система	
Алкогольный эзофагит	Нарушение перистальтики и регуляции тонуса мышц пищевода
Гастрит атрофический, геморрагический	Уменьшение защитного геля, воздействие пепсина, нарушение микроциркуляции

Основные типы поражений	Механизмы поражений
Энтерит	Замедление перистальтики, нарушение пристеночного пищеварения, всасывания витаминов и белка
Панкреатит	Секреторная недостаточность поджелудочной железы, нарушение микроциркуляции
Гепатомегалия	Прямое токсическое действие этанола на гепатоциты, развитие стеатоза вследствие периферического липолиза, усиления печеночного липогенеза
Алкогольный гепатит	Дистрофия и некрозы гепатоцитов, образование алкогольного гиалина (телец Мэллори), торможение желчевыводящей функции
Алкогольный цирроз	Деструкция паренхимы, развитие фиброза и узловой регенерации печени, внутripеченочных сосудистых анастомозов
Цирроз-рак	Снижение уровня иммунной защиты, воздействие этанола на генетический аппарат клеток
Сердечно-сосудистая система	
Гиперфункция сократительного миокарда	Гипертрофия кардиомиоцитов, набухание митохондрий
Энергетическое истощение сократительного миокарда	Дистрофия кардиомиоцитов, микро- и макронекрозы, разрушение митохондрий и других ультраструктур клеток, гипоксия миокарда
Нарушение ритма и проводимости сердца (атриовентрикулярная блокада, блокада пучка Гиса, укорочение желудочкового комплекса ЭКГ)	Этанол замедляет предсердную и атриовентрикулярную проводимость, ацетальдегид ускоряет проведение возбуждения в предсердиях, не меняя желудочковой проводимости
Гипертония	Увеличение периферического сопротивления, возбуждение симпатoadренальной системы
Атеросклероз сосудов сердца (на поздних стадиях)	Снижение синтеза липопротеидов высокой плотности и повышение синтеза липопротеидов низкой плотности
Кардиомегалия	Нарушение синтеза актина в кардиомиоцитах

Основные типы поражений	Механизмы поражений
Иммунная система	
Снижение неспецифической резистентности	Снижение фагоцитоза, бактерицидной активности сыворотки, лизоцима, уровня комплемента
Падение иммунной реактивности	Снижение количества Т-лимфоцитов, увеличение количества В-лимфоцитов, преобладание продуктивной фазы иммуногенеза над адаптивной, развитие аутоиммунных процессов
Нервная система	
Абстинентный синдром	Избыток дофамина и глутамата при недостатке ГАМК в мозге
Синдром лобной атрофии	Атрофия коры больших полушарий и коры полушарий мозжечка в результате токсического действия этанола на нервные клетки
Синдром мозжечковой дегенерации	
Алкогольная амблиопия	Расстройство центрального зрения под влиянием этанола
Алкогольная деменция	Первичная атрофия нервных клеток, расширение желудочков мозга
Корсаковский психоз (синдром Корсакова-Вернике)	Усугубление генетического дефицита ферментов обмена тиамина, поражение дорсомедиального ядра таламуса и базальных ядер переднего мозга
Миопатический синдром	Дистрофические процессы в скелетных мышцах
Алкогольная полинейропатия	Разрушение аксонов и миелиновых оболочек нервов при дефиците витаминов группы В
Система крови	
Макроцитоз эритроцитов	Прямое повреждающее действие этанола
Мегалобластный тип кроветворения	Дефицит фолиевой кислоты
Изменение формы эритроцитов	Повышенное отложение холестерина и фосфолипидов на мембране эритроцитов
Разрушение части тромбоцитов	Изменение липидного состава мембран тромбоцитов

Основные типы поражений	Механизмы поражений
Система дыхания	
Нарушение функции дыхания	Снижение жизненной емкости и максимальной вентиляции легких, уменьшение длительности задержки дыхания на вдохе и выдохе
Бронхиты, трахеиты	Катаральные воспаления трахеи и бронхов из-за выделения этанола через легкие
Пневмония	Аспирация частичек пищи в легкие, желудочно-пищеводный рефлюкс, снижение неспецифической резистентности организма
Выделительная система	
Некронефроз, или токсическая нефропатия при острой интоксикации	Токсическое действие этанола и ацетальдегида, нарушение микроциркуляции
Пиелонефрит	Активация инфекции при снижении иммунитета
Половая система	
Снижение половой функции (импотенция)	Прямое токсическое влияние этанола на половые железы, психологический конфликт
Алкогольный синдром плода	Влияние этанола на генетический аппарат половых желез, тератогенное действие алкоголя
Алкогольная (патологическая) ревность	Понижение половой потенции, чувство собственной неполноценности, психологический конфликт
Система центрального зрения	
Алкогольная амблиопия	Атрофия зрительного нерва в виде побледнения височных половин или всего диска
Сужение полей зрения	Поражение центральных отделов сетчатки, поражение сетчатки зрительного нерва

Среди систем, перечисленных в таблице 1, наибольшему депримирующему воздействию этанола на органном уровне подвержена центральная нервная система [33, 34, 35, 36]. Считается, что действие этанола на ЦНС обусловлено синаптотропными и нейротоксическими эффектами, связанными с его влиянием на ионный транспорт, обмен кальция, действие на хлорные каналы и медиаторные

системы в целом. Кроме того, экспериментальные данные и клинические наблюдения свидетельствуют, что нейротоксические эффекты этанола, вероятно, обусловлены высокой токсичностью алкоголя в отношении мозговой ткани. Так, этанол, преодолевая гематоэнцефалический барьер, накапливается в тканях нервной системы в очень высокой концентрации и приводит к гибели нервных клеток (апоптозу). При этом, было установлено, что если взять концентрацию спирта в крови за 100%, то его содержание в органах будет следующим: в желудке – 20%, кишечнике – 80%, печени – 148%, спинно-мозговой жидкости – 150%, головном мозге – 175% [37].

Несмотря на огромное количество патологических процессов, которые могут развиваться на фоне алкогольной интоксикации, каждый организм на воздействие токсиканта реагирует индивидуально. В ряде исследований показано, что формирование глубины тяжести и восприимчивости к депримирующему действию этанола на нервную систему зависит от множества факторов – путей, скорости поступления токсиканта в организм, дозы вещества, а также от пола и возраста индивидуумов [38, 39].

В зависимости от дозы и длительности воздействия этанола на организм могут развиваться острые и хронические процессы [40, 41]. Под острой интоксикацией подразумевают состояние, возникающее вслед за приемом алкоголя, которое приводит к расстройствам сознания, когнитивных функций, восприятия, эмоций, поведения или других психофизиологических функций и реакций [42]. При легких острых отравлениях этанолом, как правило, отмечается нарушение психической деятельности, возбуждение, учащение сердечных сокращений, умеренное повышение артериального давления, головокружение, тошнота, рвота. При тяжелых отравлениях происходят более глубокие нарушения деятельности ЦНС вплоть до потери сознания. К одному из серьезных типов угнетения сознания при остром отравлении этанолом относят коматозные состояния, характеризующиеся разной степенью тяжести [43, 44, 45].

В медицине принято различать три основных стадии развития алкогольной комы. Первая стадия (поверхностная) характеризуется потерей сознания,

гипертонусом мышц конечностей, возникновением тризма жевательной мускулатуры и фибрилляцией мышц. На второй (средней) стадии значительно снижается кровяное давление, мышечный тонус и естественные сухожильные рефлексы исчезают. На самой глубокой (третьей) степени алкогольной комы мышечный тонус, а естественные сухожильные рефлексы исчезают, дыхание становится аритмичным, редким [46].

Считается, что в развитии такого проявления неэлектролитного действия этанола (алкогольной комы) важная роль принадлежит нарушениям функций медиаторных систем головного мозга (опиоидной, холинергической, аденозиновой, моноаминергической, ГАМК-ергической, глутаматергической, дофаминовой и др.). Кроме того, при воздействии этанола необходимо учитывать не только эффекты собственно этанола, но и его основного метаболита – ацетальдегида. Так, было установлено, что ацетальдегид, являясь соединением, обладающим выраженным нейротропным, а при повышенных концентрациях и нейротоксическим действием, способен необратимо связываться с белками и фосфолипидами мозга, конденсироваться с биогенными аминами с образованием морфиноподобных алкалоидов, а также изменять кругооборот нейромедиаторов, импульсную активность нейронов, интегративные функции мозга и поведение животных и человека [47, 48]. Кроме того, выявлено, что ацетальдегид способен действовать и на генетический аппарат нейронов, запуская программу их гибели (апоптоз) [49].

Длительное употребление этанола приводит к развитию другого заболевания – хронического алкоголизма. Отмечается, что патологическое пристрастие к этанолу может приводить к уменьшению объёма головного мозга. Кроме того, при длительном употреблении алкоголя на поверхности коры головного мозга в местах кровоизлияний и некроза наблюдаются органические изменения нейронов [50, 51].

Клинические проявления алкоголизма зависят от стадии данной патологии. Согласно наиболее распространенной классификации, разработанной И.В. Стрельчуком (1973 г.) и существенно дополненной Г.В. Морозовым (1983 г.)

и Н.Н. Иванцом (1988, 2001 гг.), выделяют три стадии заболевания. Для первой стадии алкоголизма характерными являются следующие проявления: первичное патологическое влечение к алкоголю, снижение количественного контроля, рост толерантности к алкоголю и алкогольные амнезии. Во второй стадии утяжеляются выше описанные признаки и появляются другие симптомы: появление абстинентного синдрома, формирование систематического (постоянного) злоупотребления алкоголем, заострение основных черт личности. Для третьей стадии характерными являются истинные запои, снижение толерантности к алкоголю, а также утяжеление всех проявлений болезни, типичных для первой и второй стадий [10, 51, 14, 44].

В настоящее время в ряде исследований показано, что на формирование степени токсического поражения и характера нейротоксических процессов нервной системы существенное влияние оказывают наследственные факторы [52, 53, 54, 55, 56]. Ученые установили, что к данной группе относится ряд молекулярно-генетических маркеров, обуславливающих генетическую предрасположенность к развитию определенных ответных реакций [57, 58].

1.2. Молекулярно-генетические маркеры, определяющие индивидуальные особенности организма при воздействии этанолом

На сегодняшний день изучение реакций адаптации организма к этанолу является одной из важных задач, решение которой поможет выяснить возможные механизмы патогенеза алкоголизма. Существует множество гипотез (биологические, психологические, социальные), которые объясняют вариабельность ответов организма при интоксикации этанолом. Однако наиболее распространенными являются биологические теории, объединяющие генетические, биохимические и физиологические концепции. Ведущую роль в биологической теории отводят влиянию индивидуальных генетически детерминированных особенностей (или маркеров) [59, 60, 61]. Изучение данных маркеров позволило ученым достигнуть значительного прогресса в области

установления генетической природы множества мультифакториальных заболеваний и таких сложных аддиктивных форм поведения, как алкоголизм, наркомания и токсикомания [62, 63, 64, 65].

Экспериментальные данные и теоретические гипотезы, полученные исследователями за последние десять лет, свидетельствуют о большом разнообразии молекулярно-генетических маркеров, определяющих индивидуальный ответ организма при действии такого нейротоксиканта, как этанол [66, 67, 68, 69]. Учитывая множественность типов маркеров, стоит остановиться на рассмотрении основных характеристик и свойств каждого из них.

При выявлении механизмов формирования восприимчивости к депримирующему действию этанола, развития алкогольной зависимости, а также степени тяжести алкогольной комы внимание исследователей, в основном, сосредоточено на изучении следующих молекулярно-генетических маркеров:

- 1) ДНК-полиморфизм, гаплотип и гаплогруппа;
- 2) эпигенетические особенности генома;
- 3) экспрессия гена;
- 4) количество копий гена [70, 71].

1.2.1. ДНК-полиморфизм, гаплотипы и гаплогруппы

Согласно анализу информационных данных, весомый вклад в развитие индивидуальных признаков организма, в том числе и к воздействию агентов, вносит такой молекулярно-генетический маркер, как ДНК-полиморфизм.

Данный маркер характеризуется вариабельными участками в последовательности ДНК, которые встречаются в популяции с частотой не менее 1% [72, 73].

К числу основных полиморфных маркеров относятся:

- 1) однонуклеотидные точечные замены;
- 2) инсерции и делеции (тип мутаций, при котором происходит встраивание, либо наоборот выпадение одного или многих нуклеотидов в молекуле ДНК);

3) мини/ и микро-сателлиты (тандемно расположенные повторы из нескольких нуклеотидов) [74, 75].

Классификация и функциональная значимость наиболее распространенных ДНК полиморфизмов приведена в таблице 2 [70].

Таблица 2 – Классификация и функциональная значимость наиболее распространенных ДНК полиморфизмов

Тип полиморфизма, (частота в геноме)	Локализация	Функция	Влияние на фенотип
Синонимичные (средняя)	Кодирующие участки	Может влиять на сплайсинг, стабильность мРНК, конформацию белка, но не приводит к замене аминокислоты	От низкого до высокого
Несинонимичные миссенс, неконсервативный тип (низкая)		Замена аминокислоты в белке с изменением его физико-химических свойств	От умеренного до очень высокого
Несинонимичные миссенс, консервативный тип (низкая)		Замена аминокислоты в белке без изменения его физико-химических свойств	От низкого до очень высокого
Несинонимичные нонсенс (очень низкая)		Преждевременная терминация аминокислотной последовательности	Очень высокий
Инсерции/делеции, со сдвигом рамки считывания (низкая)		Сдвиг рамки считывания в кодирующей области с негативными последствиями для белка	Очень высокий
Полиморфизм в промотерном или регуляторном регионе (от низкой до средней)	Промотор, 5'UTR, 3'UTR	Может влиять на уровень, место и время экспрессии гена	От низкого до высокого

Тип полиморфизма, (частота в геноме)	Локализация	Функция	Влияние на фенотип
Сплайсинговый (низкая)	Первые 10 п.о. экзона на границе с интронами	Может оказывать влияние на процессы сплайсинга	От низкого до очень высокого
Инсерции/делеции, без сдвига рамки считывания (низкая)	Кодирующие или некодирующие участки	Изменение аминокислотной последовательности со вставкой или делецией аминокислот	От низкого до очень высокого
Интронный (средняя)	В интронах	Может влиять на экспрессию гена или стабильность мРНК	Очень низкий
Межгенный (высокая)	Некодирующие участки между генами	Может влиять на экспрессию гена посредством модификации энхансеров, сайленсеров или за счет других механизмов	Очень низкий

Наиболее распространенным типом полиморфных маркеров являются однонуклеотидные точечные замены, которые встречаются в среднем одна на 1000-2000 пар оснований [76, 77]. Полиморфизм такого типа может встречаться во всех структурных частях гена – промотере, энхансере, интронах и экзонах [78].

До сих пор наибольшее количество работ посвящено изучению однонуклеотидных замен (single-nucleotide polymorphism SNP), расположенных в кодирующих районах генов [79]. Данный факт объясняется тем, что чаще всего такие замены приводят к изменению структуры или функции белкового продукта гена, что легко детектируется и интерпретируется [80, 81].

Наглядным примером зависимости активности продуктов генов (кодирующих ферменты метаболизма этанола) от соответствующих полиморфизмов являются данные, полученные исследователями при определении факторов риска развития алкоголизма (таблица 3) [82, 83].

Таблица 3 – Данные, полученные исследователями при определении факторов риска развития алкоголизма

Ген	Биологическая роль	Полиморфизм		Активность продуктов
		мутация	номенклатура	
<i>ADH</i>	Окисление этанола до ацетальдегида	rs1229984 G/A (Arg47His)	ADH1B*47Arg; ADH1B*1; G	Нормальная активность фермента
			ADH1B*47His; ADH1B*2; A	Высокая активность фермента
<i>ALDH2</i>	Окисление альдегидов до ацетата	rs671 G/A (Glu487Lys)	ALDH2*487Glu; ALDH2*1; G	Нормальная активность фермента
			ALDH2*487Lis; ALDH2*2; A	Сниженная активность фермента
<i>CYP2E1</i>	Окисление этанола до ацетальдегида и ацетата	rs3813867 G/C	CYP2E1 *Pstl-; CYP2E1 *C1; G	Нормальный уровень транскрипции
			CYP2E1*Pstl+; CYP2E1 *C2; C	Высокий уровень транскрипции

Кроме данных, приведенных в таблице 3, ученым удалось выявить влияние уровня активности ключевых ферментов метаболизма этанола на развитие реакций, возникающих при употреблении алкогольных напитков. Так, в исследовании, проведенном Н.В. Солопекиным, было обнаружено, что носителям аллеля *A* (*47His) полиморфизма rs1229984 гена алкогольдегидрогеназы человека (*ADH*), характерно употребление спиртных напитков в меньшем количестве, нежели носителям аллеля *G* (*47Arg). Данная закономерность объяснялась тем, что при варианте *47His алкогольдегидрогеназа обладала повышенной активностью и обеспечивала более быстрое накопление высокотоксичного ацетальдегида. Таким образом, вследствие ускоренного накопления ацетальдегида в крови и появления таких неприятных симптомов, как сердечная аритмия, головные боли, тошнота, головокружение, люди не испытывали положительных эмоций при употреблении спиртных напитков и редко страдали алкогольной зависимостью [82].

В другом исследовании был обнаружен дополнительный протективный маркер развития алкоголизма – вариант *487Lys (аллель *A*) полиморфизма rs671 гена альдегиддегидрогеназы человека (*ALDH2*). Индивидуумы, с таким генетическим маркером, обладали пониженной ферментативной активностью, способствующей наступлению тяжелой интоксикации от воздействия ацетальдегида [84]. Также учеными было выявлено, что у носителей варианта *487Lys регулярный прием алкоголя значительно увеличивал риск развития цирроза печени, алкоголь-индуцированной астмы, рака пищевода, легких и колоректального рака [85]. Для гена, кодирующего цитохром P450 класса 2E1 (*CYP2E1* [КФ 1.14.14.1]), участвующего в микросомальной системе окисления этанола, исследователям удалось выявить несколько функционально значимых однонуклеотидных замен [86]. Одной из которых являлся однонуклеотидный полиморфизм rs3813867, расположенный в 5'-фланкирующей области гена *CYP2E1*. Так, было установлено, что гомозиготный генотип *CYP2E1**CC чаще регистрировался у больных хроническим алкоголизмом, по сравнению с группой контроля [82].

Для другого генетического маркера rs2070676 в работе А.Д. Чоговадзе с соавторами показана достоверная связь полиморфизма с развитием хронического алкоголизма. Выявлено, что наличие мутантного аллеля *G* (варианта *CYP2E1**1B), частота которого достигает 11%, также ассоциировано с повышенным риском развития алкоголизма [87].

Стоит отметить, что исследователям удалось выявить миссенс замены и в генах, кодирующих компоненты нейромедиаторных систем, в том числе дофаминовой. Одним из таких полиморфизмов являлся rs4680, расположенный в кодоне 158 (Val158Met) гена катехол-о-метилтрансферазы (*COMT*) [88]. В литературе отмечается, что данная замена гуанина на аденин в положении 1947 нуклеотидной последовательности, приводила к замене валина на метионин в 158 позиции белковой структуры фермента (Val158Met) и 3-4-кратному снижению его активности [80, 89, 90]. Кроме того, выявлено, что носители аллеля, кодирующего вариант *COMT* с низкой активностью, имели

относительно низкий уровень инактивации дофамина и, следовательно, обладали повышенной предрасположенностью к развитию алкогольной зависимости [91, 92].

Не менее функционально значимыми являются однонуклеотидные замены, расположенные в некодирующих (интроны, промоторные и регуляторные участки) последовательностях гена. В исследованиях, проведенных под руководством Г.В. Васильева, отмечается, что замены, расположенные в таких участках и затрагивающие регуляторные районы гена, способны оказывать существенное влияние на афинность связывания регуляторного белка с соответствующим сайтом, а также создавать новый или полностью разрушать существовавший сайт транскрипционного фактора, необходимый для нормальной регуляции гена. В результате, подобные нарушения могут приводить к изменению уровня транскрипции или регуляции тканеспецифичности работы гена [93, 94]

В других научных работах по поиску ассоциации аллелей с аддиктивными формами поведения было выявлено несколько значимых вариабельных участков, расположенных в некодирующей области гена дофаминового рецептора 2-го типа (*DRD2*) [95]. Для *Taq1A* полиморфизма, расположенного в 3'-нетранслируемой области показано, что носители *A1* аллеля обладали сниженным дофаминовым переносом, обусловленным небольшим количеством дофаминовых рецепторов. Сокращение данных рецепторов у индивидуумов уменьшало чувствительность к последствиям негативного влияния этанола и приводило к повышенному риску развития зависимых форм поведения, таких как алкоголизм, наркомания, азартные игры и курение [96, 97, 98]. Кроме того, было обнаружено, что злоупотребление различными психоактивными веществами связано не только с аллелем *A1*, но и с аллелем *B1* другого полиморфного локуса *Taq1B*, локализованного в первом интроне гена *DRD2* [99].

Среди всех разновидностей ДНК полиморфизма наименее изученными являются гипервариабельные районы генома, представленные тандемно повторяющимися последовательностями. Однако и для маркеров этого типа в ряде работ была получена статистически достоверная связь с различными

фенотипическими проявлениями, возникающими после употребления этанола. Так, в 3'-нетранслируемой области гена дофаминового транспортера (*DAT*) был выявлен участок (с вариабельным числом (3-11) повторов ДНК с длиной мономера 40 пар нуклеотидов), который может определять риск развития алкоголизма. Причем было обнаружено, что наличие аллеля с девятью повторами (A9) обуславливало синтез меньшего количества белка *DAT* и приводило к снижению количества дофамина, выделяемого синапсом [100, 92]. Кроме того, группой ученых под руководством M.D. Köhnke было установлено, что аллель A9 ассоциирован с риском развития алкоголизма [101].

Важно отметить, что помимо влияния генотипа на предрасположенность к различным заболеваниям, ученым удалось выявить связь ДНК полиморфизма с фармакологическим действием препаратов, используемых при лечении. По данным разных авторов, генетические факторы являются основной причиной 20 – 95% случаев всех неблагоприятных ответов (неэффективность и/или нежелательные лекарственные реакции) организма человека на лекарственные средства.

Среди исследований, связанных с изучением влияния полиморфных маркеров на фармакокинетику, фармакодинамику, клиническую эффективность лекарственных средств, наибольшее количество работ посвящено антикоагулянту непрямого действия – варфарину [102]. Подобная закономерность объясняется необходимостью правильного подбора адекватной дозы препарата, на которую оказывают влияние многие факторы, в том числе и индивидуальные. По данным европейских исследований отмечается, что зависимость оптимальной дозы варфарина от клинических факторов составляет лишь около 17%, тогда как в совокупности с генетическими – 56% [103, 104]. В настоящее время учеными обнаружено более 30 генов, которые кодируют белки, оказывающие влияние на действие варфарина. Более того, обнаружено около тысячи однонуклеотидных полиморфных маркеров этих генов. В результате проведенных исследований выявлено, что наибольший вклад в вариабельность действия варфарина оказывает полиморфизм гена цитохрома P450C9 (*CYP2C9*) и гена субъединицы 1 витамин-

К-эпоксидредуктазы (*VKORC1*). Причем для достижения целевых значений показателя свертывания крови (МНО) наибольшая средняя доза требовалась для носителей генотипа *1/*1 и G/G, а наименьшая – *2, *3 и A/A генов *CYP2C9* и *VKORC1*, соответственно [105]. Подобные исследования также проводились учеными при поиске полиморфных маркеров, влияющих на метаболизм медикаментов, широко используемых при лечении алкоголизма. Так, в генетических исследованиях, посвященных изучению алкогольной зависимости, была выявлена нуклеотидная замена аденина на гуанин в 118 положении гена, кодирующего белок опиоидного рецептора человека (*OPRM1*). Было показано, что носители аллеля *118G* являются более восприимчивыми к терапевтическому действию налтрексона – лекарственного средства, предназначенного для избавления от алкогольной зависимости [106, 107]. При анализе полиморфных вариантов генома ученым также удалось выявить еще одну важную закономерность, заключающуюся в том, что эффекты отдельных полиморфизмов, выявляемые при классическом анализе ассоциаций, как правило, могут быть связаны не только с самим изучаемым маркером, а со сцепленным с ним функционально значимым вариантом [77]. Подобные комбинации из однонуклеотидных замен, расположенных в смежных участках гена и наследуемых в данной популяции в виде единого блока, называют гаплотипом, а неслучайные ассоциации нескольких аллелей – неравновесным сцеплением. Считается, что неравновесное сцепление происходит в том случае, когда аллели, расположенные в двух различных участках генома, наследуются чаще, чем можно было ожидать [70].

Проведение гаплотипного анализа позволило ученым получить информацию о числе независимо возникших мутаций, определить риск развития и отчасти тяжесть течения заболевания [108]. Так, в работе С.С. Куличкина обнаружено, что протективным маркером в отношении развития хронического алкоголизма у якутов является гаплотип гена моноаминоксидазы А (*MAOA*) *MAOA*H*T*, включающий полиморфизмы 1460C>T и *MAOA-LPR* [109].

Помимо анализа отдельных гаплотипов ученые проводят исследования гаплогрупп (группы схожих гаплотипов, имеющих общего предка, у которого в обоих гаплотипах имела место одна и та же мутация) (таблица 4) [110, 111].

Таблица 4 – Основные типы гаплогрупп

Тип гаплогруппы	Описание генетических маркеров гаплогруппы
Y-хромосомные (Y-ДНК)	Передаются с Y-хромосомой исключительно по отцовской линии (то есть от отца сыновьям)
Митохондриальные (мтДНК)	Передаются по материнской линии (от матери всем детям)
ГКГ-гаплогруппы (главного комплекса гистосовместимости)	Являются большей частью генома или большим семейством генов, обеспечивающим развитие и функционирование иммунитета (иммунной системы)

Необходимо отметить, что анализ гаплогрупп, по сравнению с анализом гаплотипов и отдельных полиморфизмов является более трудоемким и масштабным процессом. В связи с этим количество подобных исследований не велико. Однако в большинстве опубликованных работ проводится исследование вклада митохондриальных гаплогрупп в развитие таких болезней, как ишемическая болезнь сердца, рак, аутизм [112, 113].

Стоит отметить, что большинство современных исследователей склоняются к проведению последовательного анализа ассоциаций на трех уровнях: отдельных ДНК-полиморфизмов, гаплотипов и гаплогрупп. Предполагается, что данный подход может оказаться мощным и информативным средством для выявления связей между фенотипическим и генетическим вариантом [114, 115]. Кроме того, знание генотипа по тому или иному ДНК полиморфизму может помочь ученым не только выявлять картину поражения организма при интоксикации спиртными напитками, но и позволить разработать эффективные схемы лечения при отравлениях этанолом.

1.2.2. Эпигенетические особенности

На изменение активности генов могут влиять и так называемые эпигенетические маркеры – метилирование ДНК и модификация гистонов [116, 117, 118]. В настоящее время наиболее изученным маркером является метилирование цитозиновых оснований ДНК. Данный процесс катализируется ферментом ДНК метилтрансферазой (DNMT) и заключается в переносе метильной группы с S-аденозилметионина (SAM) на цитозин в составе CpG-динуклеотида в позиции С5 цитозинового кольца. Кроме того, в ходе реакции метилирования образуется побочный токсический метаболит – S-аденозил гомоцистеин (SAH) (рисунок 1) [119, 120], 121].

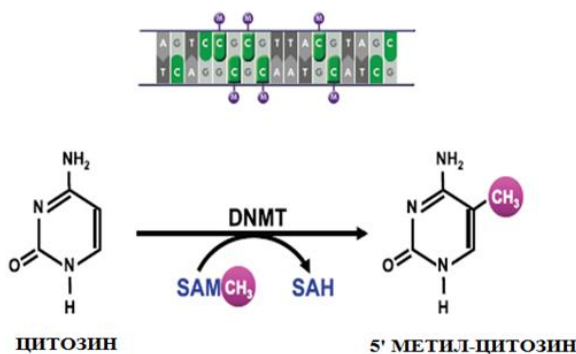


Рисунок 1 - Метилирование цитозиновых оснований ДНК составе CpG-динуклеотида

Несмотря на то, что у человека метилировано лишь около 1 % геномной ДНК, вклад данного маркера в развитие индивидуальных реакций организма достаточно велик. Так, учеными было выявлено, что процесс ДНК метилирования участвует в регуляции онтогенеза и клеточной дифференцировки, а также контролирует экспрессию множества генов [122].

В последние годы увеличилось число исследований, указывающих на то, что нарушение процессов метилирования может быть патогенетическим механизмом множества заболеваний [119]. Для оценки уровня метилирования ДНК проводят измерение количества гомоцистеина. Так, например, в некоторых исследованиях, было обнаружено повышенное содержание гомоцистеина в крови

у людей с начальной стадией алкоголизма [123, 124]. Кроме того, было установлено, что увеличенное содержание гомоцистеина было ассоциировано с повышенным уровнем метилирования как всей суммарной ДНК, так и отдельных генов [125, 126, 127].

Довольно противоречивые данные были получены среди людей с хроническим алкоголизмом. В одних работах указывается, что этой группе характерно гипометилирование ДНК [128, 129], в других, напротив – гиперметилирование [130, 131, 132, 133]. При этом, у пациентов с алкогольной зависимостью изменения уровней метилирования были выявлены в промотерных областях у следующих генов: гомоцистеин-индуцированный ER протеина (*HERP*), альфа синуклеина (*SNCA*), вазопрессина (*AVP*), фактора роста нервов (*NGF*), предсердного натрийуретического пептида (*ANP*), рецептор N-метил-D-аспартата типа 2b (*NR2b*), моноаминооксидазы А (*MAOA*), транспортера серотонина (*5-HTT*), μ -опиоидного рецептора (*OPRM1*), продинорфина (*PDYN*), проопиомеланокортина (*POMC*), транспортера дофамина (*DAT*) [125,134, 135].

Не менее важным эпигенетическим маркером являются процессы, связанные с модификацией гистонов – обширного класса ядерных белков, регулирующих транскрипцию, репликацию, репарацию и участвующих в упаковке нитей ДНК (таблица 5) [136].

Таблица 5 – Основные типы модификации гистонов

Модификация гистона	Роль в транскрипции	Модифицируемые сайты гистона
Ацетилирование	Активация	H3 (K9,K14,K18,K56) H4 (K5,K8K12,K16) H2A H2B (K6,K7,K16,K17)
Фосфорилирование	Активация	H3(S10)
Метилирование	Активация	H3 (K4,K36,K79)
	Репрессия	H3 (K9,K27)
Убиквитилирование	Активация	H2B (K123)
	Репрессия	H2A (K119)

Модификация гистона	Роль в транскрипции	Модифицируемые сайты гистона
Сумоилирование	Репрессия	Н3 Н4 (K5, K8, K12, K16) Н2А (K126) Н2В (K6, K7, K16, K17)

Изучение различных типов модификации гистонов позволило ученым выявить эпигенетические механизмы поражения печени, возникающие при употреблении гепатотоксичных доз алкоголя. Так, на модели гепатоцитов, подвергшихся воздействию этанола, был выявлен увеличенный уровень фосфорилирования двух сериновых остатков (ser-10 и ser-28) в составе гистона Н3 [137]. Подобные изменения были обнаружены и на модели *in vivo* в печени и других органах. Так, в печени крыс при хронической алкоголизации было выявлено увеличенное ген-специфическое ацетилирование сайта K9 гистона Н3 [138]. Кроме того, в других исследованиях, обнаружена ассоциация этанол-индуцированной модификации гистонов с изменением уровней экспрессии генов, кодирующих ферменты метаболизма этанола [139].

1.2.3. Количество копий гена

Зачастую формирование индивидуальных ответов организма определяют не только изменения в самих генах (мутации), но и количество копий этого гена. Так, была выдвинута гипотеза о том, что аномальная потеря, либо приобретение копий некоторых важных генов может провоцировать различные заболевания [140, 141].

К настоящему моменту ассоциации количества копий генов, определяющих индивидуальные ответы при интоксикации этанолом, с предрасположенностью к алкоголизму не выявлено. Однако примером действия такого генетического маркера может служить исследование, опубликованное 30 марта 2014 года в журнале *Nature Genetics*. В данной работе указывается, что риск к развитию ожирения определяется количеством копий гена, кодирующего пищеварительный фермент – амилазу. Учеными было обнаружено, что число копий гена амилазы (*AMY1*), локализованного на хромосоме 1, варьирует от одного до

двадцати. При этом, среди людей, имеющих лишь несколько копий гена, до 10 раз чаще встречаются те, кто страдают избыточным весом. Кроме того, при каждом исключении копии гена *AMY1*, риск ожирения увеличивается на 20%. Таким образом, наличие дополнительных копий гена *AMY1* приводит к производству большего количества амилазы, и соответственно – к лучшей способности организма расщеплять крахмал [142].

1.2.4. Экспрессия генов

Регуляция экспрессии является одним из основных путей адаптации организмов к изменяющимся условиям. Так, данный процесс позволяет клеткам контролировать не только собственную структуру, но и функции [143].

Под экспрессией генов понимают программируемый процесс, в ходе которого наследственная информация в ходе гена преобразуется в функциональный продукт – белок или РНК [143]. Гены, которые способны транскрибироваться с образованием РНК называются структурными. В свою очередь они делятся на две большие группы: конститутивные и индуцибельные. К первой группе генов относятся так называемые «гены домашнего хозяйства», которые функционируют на всех стадиях онтогенеза и во всех тканях. К их числу относят гены, кодирующие тРНК, рРНК, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, белки-гистоны, белки рибосом и др. Таким образом, конститутивные гены постоянно находятся в активном состоянии и практически не регулируются [144, 145].

Большой интерес исследователей сосредоточен на изучении индуцибельных генов («генов роскоши»), которые функционируют в разных тканях и на определенных этапах онтогенеза [146, 147]. Так, например, гены, расположенные на небольшом участке хромосомы 4q21-23 и кодирующие индуцибельные ферменты класса алкогольдегидрогеназ, экспрессируются чаще всего в разных органах. Обнаружено, что алкогольдегидрогеназы I-го класса, окисляющие перорально поступивший этанол, наиболее представлены в печени. Другой ген

ADH7 - вариант АДН IV-го класса, проявляющий высокую активность к этанолу при больших его концентрациях, экспрессируется преимущественно в кишечнике и пищеводе [83, 148]. В качестве другого индуцибельного гена можно привести ген цитохрома *CYP2E1*. Было обнаружено повышение уровня его мРНК в печени людей, злоупотребляющих алкоголем [149].

Также необходимо отметить, что, в отличие от генов «домашнего хозяйства» «гены роскоши» находятся под жёстким контролем организма и имеют сложный аппарат регуляции [147]. Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют, что регуляция экспрессии генов эукариот является сложным процессом и осуществляется на четырех уровнях: претранскрипционном, транскрипционном, трансляционном и пострансляционном [150, 151].

Первый уровень, регулирующий экспрессию генов до синтеза РНК, связан с такими структурными особенностями генома, как ДНК-полиморфизм, метилирование и количество копий гена, описанными нами ранее. Кроме описанных случаев (приведенных в предыдущих разделах) изменения уровня экспрессии генов на претранскрипционном уровне существует множество других исследований, в которых также выявлены статистически достоверные результаты. Например, для цитохрома *CYP2E1* было установлено не менее 14 вариантов гена, оказывающих влияние на уровень активности и индуцибельности фермента. Так, при изучении влияния полиморфизма гена *CYP2E1*, связанного с тандемным повтором в 5'- фланкирующей области гена (участок от 2562 до +9 н.п.), на его транскрипционную активность, показано, что у носителей мутантного аллеля *A4* она была значительно выше, чем при диком типе (аллель *A2*) [149, 152]. Другим вариантом гена *CYP2E1*, который оказывал влияние количеств синтезируемого белка, являлся однонуклеотидный полиморфизм rs2031920. Так, было обнаружено, что наличие мутантного аллеля *T* (называемого *c2*) приводило к большей транскрипционной активности. При этом, экспрессия гена у гомозигот по аллелю *T* была увеличенной в 10 раз, по сравнению с гомозиготами по аллелю *C* [153]. Кроме того, при исследовании групп больных алкоголизмом и здоровых

людей было установлено, что частота встречаемости варианта *T* была в 4,5 раза выше в группе больных со значительными повреждениями печени при хроническом злоупотреблении алкоголем [154].

Другим наиболее важным этапом регуляции экспрессии эукариотического генома является процесс транскрипции, который контролируется множеством регуляторных элементов (промоторов, энхансеров, сайленсеров, инсуляторов) и факторов [150, 151, 155.]. Так, для гена тирозингидроксилазы человека (*TH*), кодирующего белок тирозингидроксилазы *TH* (основной регулятор дофаминергической нейротрансмиттерной системы) достаточно подробно были изучены пути активации экспрессии гена, связанные с действием двух регуляторных элементов в 5'-конце гена тирозингидроксилазы: CRE (сверхконсервативная энхансерная последовательность в виде палиндрома 5'-TGACGTCA-3', чувствительная к действию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и AP-1 сайт (активируемый протеинкиназой C). Также было выявлено, что мутации хотя бы одного нуклеотида в структуре CRE приводили к снижению базальной и индуцированной экспрессии гена. Кроме изучения механизма активации гена *TH* учеными было проведено исследование по выявлению связи между уровнем его экспрессии и предрасположенностью к алкоголизму. В ходе исследования было выявлено, что врожденная предрасположенность к зависимости от алкоголя ассоциирована с изначально высоким уровнем экспрессии гена *TH* в мезолимбической дофаминовой системе мозга. Однако острый прием алкоголя снижал уровень экспрессии гена. Также было выявлено, что хроническое потребление алкоголя приводило к резкому и стойкому снижению активности гена *TH* в состоянии развитой зависимости от алкоголя [156]. В другом исследовании были получены убедительные доказательства того, что в регуляции экспрессии гена рецептора дофамина *DRD2* задействован транскрипционный ядерный фактор каппа-B (NF-κB, Nuclear Factor-Кappa-B). Нарушение регуляции экспрессии гена *NF-κB* приводило к уменьшению плотности дофаминовых рецепторов в головном мозге. Недостаточная мощность рецепторов вызывала снижение базального уровня дофамина и приводила к

развитию так называемого «Синдрома недостатка вознаграждения», связанного с риском развития аддитивных форм поведения – алкогольной и наркотической зависимости [97, 95].

Механизмы трансляционной и посттрансляционной регуляции генной экспрессии также весьма многообразны. Одним из механизмов контроля экспрессии генов является изменение последовательности пар нуклеотидов в 5' и 3'-концах мРНК, модификация которых может изменить длительность жизни мРНК. Так, делеции AU последовательности в 3'-нетранслируемом участке мРНК, транскрибированной с гена активатора апоптоза (*C-FOS*), приводят к увеличению концентрации, продолжительности жизни матричной РНК и накоплению белка. Также было обнаружено, что на время жизни мРНК влияет изменение и первых кодонов 5' – области гена, определяющих, сигнальную последовательность полипептидной цепи [157, 158].

Посттрансляционные изменения оказывают влияние на ферментативную активность уже синтезированного белка. Так, в некоторых исследованиях отмечается снижение каталитической активности изоферментов алкогольдегидрогеназы после ковалентных химических модификаций [159].

Помимо механизма генной экспрессии ученые также изучают влияние количества вещества на тип регуляции этого процесса. Так, в одном из исследований была разработана гипотеза о влиянии дозы этанола на запуск того или иного этапа регуляции экспрессии. Учеными предполагалось, что малые дозы алкоголя повышали уровень *CYP2E1* вследствие посттрансляционной стабилизации его молекулы, в то время как высокие дозы усиливали экспрессию *CYP2E1* на уровне транскрипции [160].

Стоит отметить, что при изучении данного маркера внимание исследователей сосредоточено на изучении уровня экспрессии генов, кодирующих не только ферменты метаболизма, но и нейрорегуляторные вещества, которые могут оказывать влияние на формирование ответных реакций при интоксикации этанолом. Так, например, в работе, проведенной под руководством В.А. Кашуро было изучено влияние депримирующих веществ

(этанол и оксибутирата) на синтез нейротрофических факторов, являющихся естественной защитной реакцией мозга в первые минуты ишемии. В ходе исследования было выявлено, что через 3 часа после однократного внутрибрюшинного введения крысам этанола в токсической дозе происходило быстрое нарастание уровня специфического белка астроцитарной глиии (S-100), глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP) и нейротрофического фактора головного мозга (BDNF). Кроме этого, учеными предполагалось, что увеличение уровня BDNF в крови крыс в проведенных экспериментах, вероятно, может быть следствием увеличения его синтеза в структурах мозга в ответ на введение высокотоксичной дозы этанола [161].

Полученные данные согласовывались с работой, в которой отмечалось, что внутрибрюшинное введение этанола мышам вызывает достоверную активацию мРНК для BDNF в таких структурах мозга, как гиппокамп и дорзальный стриатум. Причем этанол вызывал дозозависимое усиление экспрессии генов *Bdnf* в культуре нейронов гиппокампа крыс [162].

Стоит отметить, что, к настоящему моменту при анализе литературных данных, выявлено большее количество работ, в которых была обнаружена связь уровня экспрессии генов с развитием хронического алкоголизма по сравнению с исследованиями, связанными с изучением влияния количества синтезированного белка на степень интоксикации этанола. Однако, для понимания механизмов формирования глубины депримирующего воздействия этанола на нервную систему предпочтительнее было бы проводить исследования, связанные с изучением профиля генной экспрессии при отравлениях различной степени тяжести.

Таким образом, проведенный анализ экспериментальных и теоретических работ, позволяет сделать вывод о том, что углубленные исследования каждого маркера могут послужить основой для открытия новых функциональных особенностей генов различных систем и их связи с формированием ответов организма при употреблении этанола. При этом, исходя из перечисленных свойств маркеров, наиболее информативными и функционально значимыми,

вероятнее всего, могут быть ДНК-полиморфизм (а именно наиболее распространенные однонуклеотидные точечные замены) и уровень экспрессии генов.

1.3. Генетические особенности ГАМК-ергической системы, определяющие индивидуальный ответ при действии этанола на организм

При рассмотрении различных типов маркеров было выявлено, что наибольшее количество исследований было связано с изучением генетических особенностей ферментов метаболизма этанола. Однако данных об индивидуальных особенностях рецепторных систем, чувствительных к этанолу, приводится значительно меньшее количество. Учитывая этот факт, целесообразным является дополнительное теоретическое изучение и проведение экспериментальных исследований генов, кодирующих компоненты нейромедиаторных систем.

Известно, что патогенетические механизмы поражения нервной системы при интоксикации этанолом весьма многообразны [163]. Однако в последние годы внимание исследователей привлекает ГАМК-ергическая система головного мозга и выяснение ее роли в эффектах, возникающих при употреблении алкоголя [7, 40, 43, 44]. В ряде работ, отмечается, что разнонаправленные нарушения в ГАМК-ергической системе играют особую роль в формировании неврологической картины острого и хронического отравления этанолом. Экспериментально обоснованным является ослабление ГАМК-ергической передачи и снижение общей активности данной системы при хроническом потреблении алкоголя. Ряд поведенческих эффектов острого воздействия этанола, напротив, обусловлен активацией ГАМК-ергической системы. При этом вовлеченность ГАМК-ергической трансдукции в патогенез алкоголизма и абстинентного синдрома не вызывают сомнения [164, 47, 165, 166].

К настоящему моменту исследователями было выявлено, что ГАМК-ергическая система является совокупностью взаимосвязанных тормозных

нейронов, секретирующих в качестве нейротрансмиттера гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) [167]. Обнаружено, что ГАМК, синтезирующаяся из глутаминовой аминокислоты с помощью фермента гутаматдекарбоксилазы, локализуется в нейронах, использующих ГАМК как тормозящий нейротрансмиттер.

На сегодняшний день точные механизмы усиления ГАМК_A-ергической передачи при воздействиях этанолом остаются предметом дискуссий. Однако считается экспериментально обоснованным, что ряд поведенческих эффектов острого воздействия этанола обусловлен активацией ГАМК-ергической системы, в основе которой лежит индукция поступления в нейроны ионов хлора, опосредуемого стимуляцией комплекса ГАМК-рецептор/ионный канал [27, 168]. При этом, отмечается, что действие этанола в низких концентрациях, скорее, обусловлено потенцированием эффектов, связанных с открытием канала для ионов хлора. В высоких концентрациях этанол, предположительно, прямо активирует хлорный канал [16, 51].

Многочисленные исследования позволили выявить две важнейшие функции ГАМК в головном мозге – медиаторную и метаболическую [169, 170]. При этом установлено, что с метаболической функцией ГАМК связано ее участие в процессах регуляции метаболизма мозга, активации синтеза АТФ, воздействия на транспорт глюкозы, удаления токсичных продуктов обмена; активации синтеза белков, а также стимуляции выработки гормона роста гипофизом. К медиаторной функции ГАМК учеными было принято относить следующие процессы: контролирование двигательной активности, улучшение динамики нервных процессов в головном мозге, повышение продуктивности мышления и формирования эмоционального поведения. Полагают, что медиаторная функция ГАМК реализуется посредством связывания со специфическими ГАМК-ергическими рецепторами, которые являются сложными белками, имеющими участки узнавания для ГАМК, барбитуратов и бензодиазепинов, которые воспроизводят многие эффекты этанола [16, 51, 171].

ГАМК-рецепторы в последнее время принято подразделять на два типа: ионотропные (ГАМК_A и ГАМК_C) и метаботропные (ГАМК_B) [172, 173].

Наиболее распространенными являются ионотропные рецепторы, представляющие собой мембранные хемочувствительные хлорные каналы, которые содержат несколько топографически отличающихся связывающих участков, предназначенных как для взаимодействия с основным медиатором (ГАМК), так и для аллостерических регуляторов: этанола, бензодиазепинов, барбитуратов, конвульсантов, нейростероидов (рисунок 2) [164].

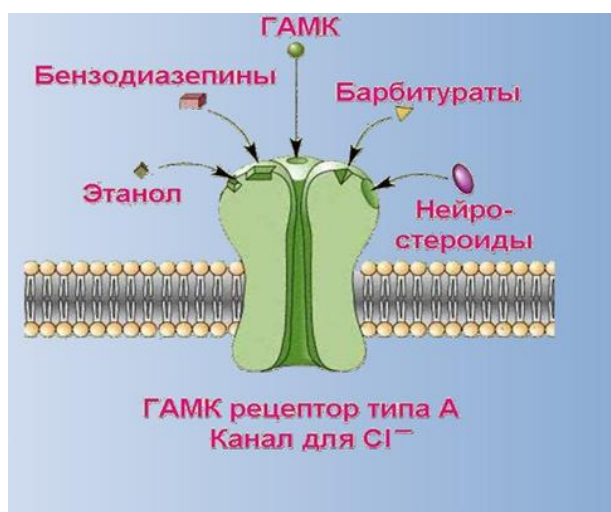


Рисунок 2 – Структура ГАМК_A-рецептора

Считается, что именно один из подтипов этих рецепторов (ГАМК_A) вовлечен в формировании множества различных биологических эффектов организма при остром и хроническом воздействии алкоголя. Так, этанол, являясь аллостерическим модулятором, связывается с ионотропным ГАМК_A рецептором, меняет его пространственную организацию и повышает чувствительность ионного канала к ГАМК. Молекула ГАМК связывается с рецептором ионного канала. Ионный канал, обладающий довольно сложным строением, раскрывается и начинает пропускать внутрь клетки отрицательно заряженные ионы хлора. Под воздействием этих ионов происходит гиперполяризация мембраны, и клетка становится менее восприимчивой к возбуждающим сигналам других нейронов. Наступает алкогольное гиперрасслабление, которое при продолжении употребления может дойти до алкогольной комы – настолько сильным

оказывается угнетающее действие спирта на центральную нервную систему [174, 175].

При изучении структуры ГАМК_A-рецептора было выявлено, что он представляет собой гетероолигомерную белковую молекулу, состоящую из множества субъединиц. На сегодняшний день, исследователями было обнаружено как минимум, 16 субъединиц, которые сгруппированы в семь классов: α , β , γ , δ , ϵ , π и θ (таблица 6) [171, 176, 177].

Таблица 6 – Субъединицы ГАМК_A-рецептора

Класс субъединицы	Наименование субъединицы
α	GABRA1, GABRA2, GABRA3, GABRA4, GABRA5, GABRA6
β	GABRB1, GABRB2, GABRB3
γ	GABRG1, GABRG2, GABRG3
δ	GABRD
ϵ	GABRE
π	GABRP
θ	GABRQ

В пределах каждого класса субъединицы имеют 60 – 70% гомологии; степень гомологии между классами составляет только 30 – 40%. Комбинации различных субъединиц обуславливают существование множества изоформ рецепторов, устанавливают кинетику активации рецепторов и оказывают влияние на их десенситизацию, а также определяют специфичность эффектов выше описанных аллостерических модуляторов ГАМК рецепторов [167, 169].

При изучении функций отдельных субъединиц было выявлено, что α_1 -содержащий рецептор в большей степени определяет седацию, поскольку направленная мутация этого участка (замена аргинина на гистидин в 101 положении) вызывала резистентность трансгенных мышей к седативному и амнестическому эффекту диазепама, не влияя на его транквилизирующее действие. При этом такие же мутации в α_2 -субъединице ГАМК_A-рецептора приводили к развитию резистентности к транквилизирующему действию бензодиазепинов. Кроме того, ученые предполагают, что α_2/α_3 -субъединицы определяют анксиолитическое действие, α_6 – гипнотический эффект. Также было

обнаружено, что мыши, нокаутированные по α_6 -субъединице, нечувствительны к барбитуратам и этанолу [1, 178, 179].

Помимо изучения функции субъединиц ученые проводили комплексные молекулярно-генетические исследования по установлению вариантов субъединиц, входящих в состав функциональных ГАМК_A-рецепторов. Так, электрофизиологические опыты на ооцитах лягушки, содержащих различные комбинации субъединиц, показали, что рецепторы, состоящие из α - и β -субъединиц, чувствительны к воздействию ГАМК (возрастает проницаемость мембран для ионов хлора), но для полного связывания с бензодиазепинами необходимо наличие γ_2 -субъединицы [177]. Также утверждалось, что чаще всего функциональные ГАМК_A-рецепторы формируются при комбинации субъединиц типа α_{1-6} , β , γ_2 и δ [164]. Таким образом, было выявлено, что большинство ГАМК_A-рецепторов в головном мозге млекопитающих представлено в виде пентамерных комплексов, состоящих из двух α -, двух β - и одной γ - (либо δ -) – субъединиц, которые располагаются вокруг хлоридной поры. Предполагается, что место, где ГАМК присоединяется к рецептору (GABA site) расположен на поверхности стыка α и β субъединиц; сайт связывания бензодиазепинов (BDZ site) – на поверхности стыка α и γ субъединиц, сайт этифоксина (ETF site) – на β субъединице, сайт нейростероидов (NS site) – в канале (рисунок 3).

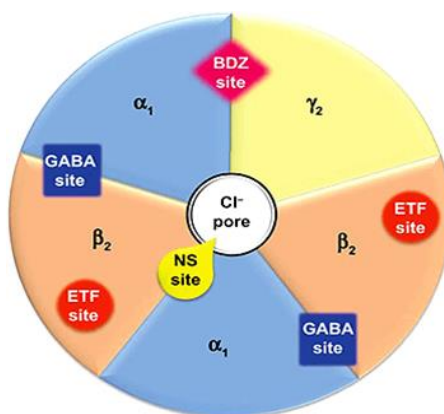


Рисунок 3 – Пентамерный комплекс ГАМК_A-рецептора [179]

Сайты связывания барбитуратов и этанола предположительно находятся в глубине канала (на трансмембранных доменах). В случае барбитуратов, вероятно,

главную роль играет β -субъединица, с этанолом же взаимодействуют разные субъединицы [180].

При изучении структуры ГАМК_A-рецепторов, определяющих формирование ответов организма при интоксикации этанолом, были получены достаточно противоречивые данные. Так, в некоторых работах удачными биологическими моделями при изучении эффектов этилового спирта на ГАМК-ергическую систему являлись конструкции рецепторов, содержащие δ -субъединицу, α_5 -субъединицу и α_4 -субъединицу. Отмечается, что ГАМК_A-рецепторы типа $\alpha_4\beta_3\delta$ оказались высоко чувствительными к этанолу в концентрациях < 30 мМ (оценивалась способность спирта усиливать ГАМК-индуцированные хлорные токи в рецепторах, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*) [181]. В других исследованиях также отмечалось участие рецепторов типа $\alpha_6\beta_3\delta$ -ГАМК_A и α_1/δ -ГАМК_A [182]. В последние годы внимание ученых сосредоточено не только на изучении влияния комбинаций различных типов субъединиц на функциональные свойства ГАМК_A рецепторного комплекса. В ряде работ отмечается вовлеченность индивидуальных особенностей генов, кодирующих соответствующие субъединицы рецептора, в механизмы, ответственные за адаптацию ГАМК_A-рецепторов при этаноловой интоксикации [171, 24, 183, 184]. На сегодняшний день, в большинстве этих работ приводятся данные о взаимосвязи генов, кодирующих разные субъединицы ГАМК_A-рецепторов, с формированием алкогольной зависимости, как у крыс, так и у человека [176, 185]. Интересно отметить, что в некоторых исследованиях проводилось изучение целых групп генов (кластеров), (кодирующих отдельные субъединицы рецептора), которые располагались в пределах одной хромосомы. Предполагалось, что такое расположение генов может быть связано с их общим признаком. В ходе таких исследований было выявлено, что в развитии алкоголизма может играть существенную роль кластер генов (*GABRA2*, *GABRA4*, *GABRB1* и *GABRG1*), локализованный на четвертой хромосоме [186, 187, 188].

Также другие многочисленные генетические исследования на клетках человека позволили заключить, что в развитии зависимости от этанола и других наркотических веществ в том числе могут быть задействованы гены, расположенные на других хромосомах, и кодирующие α_1 -, α_6 -, β_2 -, β_3 -, γ_2 - и γ_3 -субъединицы с различным преимуществом в разных этнических группах (рисунок 4) [20, 171, 185, 189].

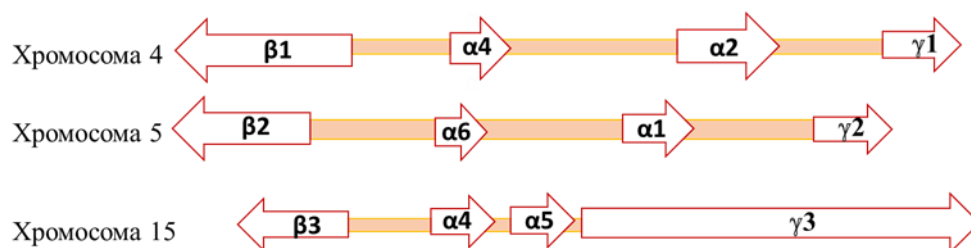


Рисунок 4 – Кластеризация генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора у человека

Несмотря на большой список генов, задействованных в формировании риска развития аддиктивных форм поведения, количество выявленных достоверно ассоциированных полиморфных маркеров (расположенных в их нуклеотидной последовательности) с предрасположенностью к алкоголизму недостаточно велико. Так, в исследовании A. Picusci-Lagha была обнаружена статистически достоверная связь синонимичной однонуклеотидной замены rs279858 в гене *GABRA2* с предрасположенностью к употреблению спиртных напитков. Выявлено, что носители аллеля G этого полиморфного маркера способны медленнее реагировать на воздействие алкоголя и тем самым они более склонны к алкоголизму, чем люди с генотипом A/A [190]. Также в исследованиях, проведенных на пациентах, страдающих алкогольным циррозом печени, было показано, что у генотипа, включающего ген цитохрома P450 – *CYP2E15B* в сочетании с геном, кодирующим γ_2 -субъединицу ГАМК_A-рецептора, в несколько раз повышается риск возникновения и развития цирроза печени у алкоголиков [164].

Для другого генетического полиморфизма γ_2 -субъединицы, следствием которого является изменение последовательности аминокислот треонина на

аланин в положении 11 белка, были выявлены достоверные различия симптомов отнятия алкоголя, отвращения к его вкусу, а также нарушения координации движений и гипотермией, вызванными этанолом [15]. Также необходимо отметить, что существует ряд работ, в которых выявлены полиморфизмы, являющиеся только кандидатами риска развития алкоголизма. При этом статистически достоверная связь того или иного аллеля и генотипа пока не обнаружена. Так, например, мета-анализ, проведенный группой исследователей под руководством Dawei Li позволили обнаружить множество полиморфизмов, ассоциированных с различными формами аддиктивного поведения. При генотипировании 4739 пациентов и 4924 людей, вошедших в группу контроля по различным вариантам генов *GABRB2*, *GABRA6*, *GABRA1*, *GABRG2* и *GABRA2* была обнаружена достоверная ассоциация с алкогольной зависимостью только для следующих полиморфизмов: *GABRA2* (rs567926 rs279858), *GABRG2* (rs211014), *GABRA6* (rs3219151) [22]. При этом, отмечалось, что углубленное изучение этих полиморфизмов может способствовать обнаружению конкретного аллеля характерного для людей, подверженных чрезмерному употреблению спиртных напитков.

Кроме того, при выявлении патогенетических моделей алкоголизма помимо выявления полиморфных вариантов генома, ученые проводили сравнительный анализ уровня экспрессии генов на фоне хронического и острого употребления этанола. Так, в работе С.Н. Wu на модели отравления этанолом мышей было выявлено, что хроническое воздействие токсикантом приводило к уменьшению уровня экспрессии гена, кодирующего α_1 -субъединицы, и уменьшению мРНК α_6 - и γ_2 -субъединиц. Для генов, *Gabrb2* и *Gabrb3* изменения уровня экспрессии генов выявлено не было. Кроме того, в этом исследовании было обнаружено увеличение уровней экспрессии *Gabra1* и *Gabrb3*, тогда как уровни мРНК для генов *Gabra6*, *Gabrb2* и *Gabrg2* оставались неизменными [191]. В другой работе J. Petrie, показано, что спустя 2 суток с момента окончания хронической алкоголизации крыс в мозжечке определялось повышенное содержание α_6 -субъединицы ГАМК_A-рецептора, а в гиппокампе достоверно снижалось соотношение мРНК,

кодирующих сплайс-варианты γ_2 -субъединицы, соответственно, g 2L (long isoform) и g 2S (short isoform). При этом, концентрация белка α_6 -субъединицы в мозжечке "зависимых" крыс возвращалась к исходному уровню лишь к седьмым суткам после окончания хронической алкоголизации [25, 26].

Кроме того, для генов *Gabra1* и *Gabra4* учеными была выдвинута экспериментально обоснованная гипотеза о том, что при многократном воздействии этанола на крыс происходит снижение уровня мРНК для α_1 -субъединицы и увеличение – для α_4 -субъединицы в коре большого мозга [24, 192]. Таким образом, это предположение, по мнению исследователей, может указывать на важную потенциальную роль *Gabra4* в формировании эффектов этанола у организмов [24]. Несмотря на разнообразие приведенных результатов, данных о связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецепторов с глубиной депримирующего действия этанола на нервную систему, пока не выявлено.

Проведенный обзор литературы позволяет сделать вывод о том, что для повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий при острой интоксикации этанолом и алкоголизме, необходимо провести дополнительное изучение влияния молекулярно-генетических факторов (функционально значимых полиморфизмов и процесса экспрессии) ГАМК_A-рецептора на развитие алкогольной интоксикации, а также на основании полученных результатов разработать генетические маркеры, определяющие глубину депримирующего действия этанола. В качестве генов-кандидатов целесообразно использовать гены, кодирующие все типы альфа субъединицы (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*), а также ген *Gabrb1*, кодирующий β_1 -субъединицу. Выбор данных генов обусловлен несколькими причинами. Во-первых, из 16 субъединиц, формирующих множество изоформ рецепторов, альфа субъединицы входят в состав наиболее распространенных и функционально-значимых форм ГАМК_A-рецепторов: $\alpha_1\beta\gamma_2$ -, $\alpha_2\beta\gamma_2$ -, $\alpha_3\beta\gamma_2$ -, $\alpha_4\beta\gamma_2$ -, $\alpha_5\beta\gamma_2$ -, $\alpha_6\beta\gamma_2$ -, $\alpha_4\beta\delta$ -, $\alpha_6\beta\delta$ [179]. Во-вторых, несомненно важным для функционирования ГАМК_A-рецептора является наличие двух альфа и двух бета субъединиц. В-третьих, участие гамма и дельта

субъединиц в процессе формирования ответных реакций нервной системы при действии этанола являются мало изученными, тогда как научно обоснованным является влияние мутаций остатков определенных аминокислот в α - или β -субъединицах на проявления токсического процесса, а также на способность этанола усиливать реакции ГАМК [1, 178, 193]. Из трех β -субъединиц (β_1 -, β_2 -, β_3 -), в исследование включается β_1 -субъединица, поскольку для гена, кодирующего ее аминокислотную последовательность, представлено достаточное количество исследований, указывающих на роль гена *Gabrb1* в патогенезе алкоголизма [185, 187, 194].

Таким образом, для достижения поставленной цели, представляется важным провести исследования в следующих направлениях: во-первых, изучить профиль экспрессии генов ГАМК_A-рецептора после острого и длительного воздействия этанолом, а также установить связь уровней экспрессии генов с глубиной депримации этанолом; во-вторых, определить функционально значимые полиморфные варианты генов ГАМК_A-рецептора, которые могут определять вариабельность симптоматики при отравлении крыс в ответ на введение этанола; в-третьих, установить генетические маркеры, прогнозирующие степень тяжести интоксикации этанолом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач и достижения цели исследования использовали комплекс научных приемов, включающий токсикологические, биохимические, молекулярно-биологические и статистические методы исследований.

2.1. Животные и их содержание

Экспериментальные исследования выполнены на 155 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область).

До начала эксперимента животных выдерживали в течение 14 дней в отдельном карантинном помещении. В этот период проводился ежедневный осмотр каждого животного (оценивалось поведение и общее состояние), дважды в день животные наблюдались в клетках (заболеваемость и смертность). С помощью метода рандомизации перед началом исследования крысы, отвечающие критериям включения в исследование, распределялись на группы по 12 особей. Животные, не соответствующие критериям включения в исследование, исключались из исследования в течение карантина.

Животные во всех экспериментах содержались в виварии группами по 6 особей в стандартных условиях освещения и питания при свободном доступе к воде и пище. Световой режим: 12 часов – свет, 12 часов – темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 20-22°C, относительная влажность – 50-70%. Устанавливался режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ не более 0,15 объемных %, аммиака – не более 0,001 мг/л [195]. За один день до начала тестирования крысы помещались в экспериментальную комнату. Животных маркировали раствором пикриновой кислоты.

Опыты были проведены в соответствии с Национальными и Международными Правилами работы с лабораторными животными, на основании Приказа Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Положения комиссии по биоэтике ФГБУН ИТ ФМБА России.

2.2. Характеристика токсического агента

В качестве токсического агента использовали спирт этиловый (C_2H_5OH , этанол) 95% для наружного применения и приготовления лекарственных форм, производство ООО «Константа-Фарм М» (Россия). Вводили внутривенно в виде 33% водного раствора.

2.3. Определение токсикометрических параметров этанола

В качестве токсикометрического параметра этанола определяли его среднюю смертельную дозу (LD_{50}), которую вычисляли предварительно перед каждой серией экспериментов «табличным экспресс-методом» по В.Б. Прозоровскому [196, 197]. Выживаемость оценивали в течение 1-х суток [198].

2.4. Схемы моделирования поражения этанолом

Для моделирования поражения применяли схему острого отравления этанолом в двух вариантах:

- 1) без предварительной алкоголизации – группа крыс, перенесших острое отравление этанолом;
- 2) после предварительной алкоголизации крыс – группа крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации.

Предварительную алкоголизацию животных проводили в течение 1 месяца путём ежедневного внутрижелудочного введения 40% раствора спирта этилового (этанол) в дозе 5 г/кг (2 недели) и 7 г/кг (2 недели) [199].

Острое отравление этанолом у животных на фоне предварительной алкоголизации и без нее вызывали внутрибрюшинным введением 33% раствора этилового спирта (этанола) в дозе, равной 0,8 ЛД₅₀.

2.5. Общая схема проведения исследования

Для моделирования интоксикации использовали этанол. Острое алкогольное отравление вызывалось у исследуемых животных путём внутрибрюшинного введения раствора этилового спирта.

На первом этапе экспериментальных исследований проводили определение токсикометрического параметра этанола у крыс.

На следующем этапе изучали влияние острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов-кандидатов (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1*). Для исследования использовали следующие группы животных:

- группа №1 (n=20) – интактные крысы (образцы крови и тканей отбирались без введения этанола);

- группа №2 (n=92 [*Gabra1*], n=85 [*Gabra2*], n=81 [*Gabra3*], n=83 [*Gabra4*], n=86 [*Gabra5*], n=92 [*Gabrb1*] – крысы, подвергшиеся острому воздействию этанола (образцы крови и тканей отбирались спустя 8 часов после острого отравления этанолом в дозе 0,8 ЛД₅₀);

- группа № 3 (n=20) – крысы, подвергшиеся хроническому воздействию этанола в течение одного месяца (образцы крови и тканей отбирались спустя 4 недели ежедневного внутрижелудочного введения 40% раствора спирта этилового (этанола) в дозе 5 г/кг (2 недели) и 7 г/кг (2 недели);

- группа №4 (n=13) – крысы, подвергшиеся острой алкогольной интоксикации на фоне хронического воздействия этанола в течение одного

месяца (образцы крови и тканей отбирались спустя 8 часов после острого отравления этанолом в дозе 0,8 ЛД₅₀).

Вариабельность количества животных во второй группе обусловлена особенностями метода генотипирования образцов по исследуемым генам-кандидатам.

Определение уровней экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, проводили в крови, а также в тех органах (головной мозг и печень), изменения в которых играют определяющую роль в патогенезе алкогольной болезни [200]. Кровь использовали как наиболее доступный биологический материал для экспериментальной диагностики. Среди множества отделов головного мозга для исследования был выбран гиппокамп, важную роль в регуляции возбудимости которого играет тормозная ГАМК-ергическая система. Кроме того, отмечается, что именно этот отдел мозга вовлечен в формирование толерантности к воздействию алкоголя, а также играет центральную роль в формировании памяти [201].

У животных каждой группы были отобраны образцы крови, головного мозга и печени, из которых были выделены образцы РНК. С использованием метода обратной транскрипции из образцов выделенной РНК были получены образцы кДНК. Полученные образцы кДНК использовали в качестве матрицы для количественного метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), с помощью которого проводили определение уровня экспрессии генов. Полученные результаты представляли в виде относительного уровня (относительно гена *18s pPНК*, уровень экспрессии которого принимали за 100%) экспрессии (УЭ, %) исследуемых генов. Для сравнения уровней экспрессии генов УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* в группах использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса или U-тест Манна Уитни. Множественное сравнение показателей проводили с применением критерия Данна. Различия считали статистически-достоверными при $p < 0,05$ для каждого из критериев [202]. На основании сравнения показателей УЭ у четырех экспериментальных групп оценивали влияние острого и

длительного воздействия этанола на экспрессию генов-кандидатов. Далее проводили выявление связи рассчитанных значений УЭ генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола у крыс спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀.

На следующем этапе, основываясь на результатах теоретических исследований, в генах-кандидатах были определены наиболее значимые полиморфизмы, которые могут влиять на функциональные особенности ГАМК_A-рецептора. Далее у теоретически выбранных полиморфизмов изучали их распределение в исследуемой популяции крыс и обосновывали замены, которые могут определять глубину депримации при интоксикациях этанолом. Для этого до острого воздействия этанолом у исследуемых крыс отбирали образцы крови, выделяли ДНК и проводили генотипирование с использованием метода ПЦР-РВ.

После проведения генотипирования экспериментальных животных изучали влияние выявленных генотипов на уровень экспрессии генов.

На заключительном этапе экспериментальных исследований определяли ассоциацию исследуемых полиморфизмов с тяжестью депримирующего действия этанола на нервную систему животных после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Для этого у крыс спустя 3 ч (по достижению глубокого угнетения ЦНС) и 8 ч (по достижению физиологической нормы ЦНС) после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀ проводили оценку состояния экспериментальных животных с использованием алгоритма, описанного в разделе 2.6. Впоследствии с использованием комплекса методов статистического анализа проводили установление ассоциации генотипов с выявленными признаками.

2.6. Методы оценки острой токсичности этанолом

Оценку выраженности острого отравления этанолом животных, получивших дозу этанола 0,8 ЛД₅₀, проводили с использованием математической модели, разработанной В.А. Башариным.

В ходе эксперимента проводили контроль состояния корнеальных, зрачковых, глоточных и сгибательных рефлексов, а также осуществляли оценку внешне выраженных реакций крыс на тактильно-болевое раздражение.

Использование балльной системы индекса тяжести неврологических нарушений (ИТНН) позволило сопоставить состояние экспериментальных животных с соответствующими степенями острого алкогольного отравления у человека [1]:

Формула расчета ИТНН:

$$\text{ИТНН} = 5 \times \text{ПЖ} + 4 \times \text{ГР} + 3 \times \text{БР} + 2 \times \text{РС} + 2 \times \text{ЗР} + \text{КР},$$

где следующие показатели, были выражены в баллах от 1 (наибольшая степень угнетения) до 4 (отсутствие угнетения):

ПЖ – поведение животных (визуальная оценка состояния животного при нахождении крысы в клетке и в руках исследователя);

ГР – глоточный рефлекс (при надавливании на корень языка зондом вызывались глотательные движения);

БР – оценка тактильно-болевого чувствительности (болевым раздражителем наносили сжатием хвоста пинцетом);

РС – рефлекс сгибания задних конечностей (путём сжатия задней конечности пинцетом наблюдалось её сгибание или сокращением брюшной стенки);

ЗР – зрачковый рефлекс (после освещения глаза животного можно наблюдать его сужение (миоз), а затем расширение до нормы);

КР – корнеальный рефлекс (при осторожном прикосновении волоском к роговице глаза крысы наблюдается закрытие век).

ИТНН в баллах отражал состояние экспериментальных животных, соответствующее степени острой алкогольной интоксикации у человека (таблица 7).

Таблица 7 – Оценка состояния экспериментальных животных на основании балльной системы ИТНН

Порядковый номер физиологического состояния экспериментальных животных	Физиологическое состояние экспериментальных животных	Значение ИТНН, балл
1	Уровень физиологической нормы	≥ 55
2	Оглушение	от 46 до 55
3	Сопор	от 36 до 45
4	Кома поверхностная	от 26 до 35
5	Кома глубокая	от 18 до 25
6	Кома терминальная	≤ 17
7	Летальный исход	-

Для состояния, которое оценивалось как «оглушение», были характерны: снижение двигательной активности, положение животного на животе или на боку, снижение поисковой реакции при переносе из клетки на открытую поверхность, сохранение или замедление рефлекса переворачивания, атаксия, координированная защитная реакция на боль, выраженный рефлекс сгибания конечности. Животное точно локализовало место раздражения, реакция на пищевой раздражитель была снижена, а аудиомоторная реакция сохранена.

При «сопоре» – животное лежало в клетке, при взятии на руки были возможны нецеленаправленные движения, в основном отмечалась гипотония мышц (наличие гипертонуса или гипотонии связано с особенностями действия токсиканта), при нанесении болевых раздражений возникали направленные на их устранение координированные защитные движения с поворотом туловища в сторону раздражения, аудиомоторная реакция в основном сохранена, выявлялись корнеальные, глоточные и зрачковые рефлексы. В случае развития у животных миоза выявление зрачкового рефлекса было затруднено.

Для «поверхностной комы» было характерно боковое положение животного или положение на животе, отсутствие двигательной активности при взятии на руки, снижение тонуса мышц (атония) и болевой реакции на сжатие лапы или хвоста, сохранение корнеального рефлекса и снижение глоточного рефлекса. Отмечалось урежение частоты дыхательных движений.

«Глубокая кома» характеризовалась отсутствием роговичного рефлекса, болевой чувствительности и рефлекса сгибания конечностей, снижением или отсутствием глоточного рефлекса, выраженным уменьшением частоты дыхательных движений и частоты сердечных сокращений.

Проявлениями «терминальной (запредельной) комы» были отсутствие всех исследуемых рефлексов, возможно развитие мидриаза, замедление или отсутствие реакции зрачков на свет, резко выраженные нарушения витальных функций (расстройства ритма и частоты дыхания или апноэ, патологическое дыхание, снижение частоты сердечных сокращений и аритмии) [1].

2.7. Методы отбора образцов крови и тканей лабораторных животных

Для генотипирования проводили отбор образцов крови у лабораторных крыс путем надреза в области губной вены. Далее отбирали 0,5 – 1,5 мл крови в пробирки типа Eppendorf. В качестве антикоагулянта использовали ЭДТА (в концентрации 50 mM), который добавляли в каждую из пробирок по 60 мкл. Пробирки с кровью хранили при температуре 4°C не более одного месяца.

Для определения уровня экспрессии генов проводили отбор образцов крови и тканей головного мозга (гиппокампа), печени у лабораторных животных.

Образцы крови в объеме 150-300 мкл отбирали в 2 мл пробирки типа Eppendorf до и после интоксикации этанолом. Далее в каждую пробирку добавляли по 500 мкл раствора, стабилизирующего РНК – RNAlater Solution (Ambion, США). Для проникновения стабилизирующего раствора в клетки образцы крови с реагентом выдерживали в течение 24 часов при 4°C. Полученные

пробирки с образцами хранили при температуре минус 20°C не более одного месяца.

Отбор образцов головного мозга (гиппокампа) и печени у лабораторных животных проводили после декапитации крыс в условиях CO₂-анестезии. Масса каждого образца составляла приблизительно 40-60 мг. Образцы тканей после декапитации быстро выделяли и помещали в 2 мл пробирки типа Eppendorf, содержащие по 750 мкл РНК стабилизатора RNAlater Solution (Ambion, USA). Образцы тканей с реагентом выдерживали в течение 24 часов при 4°C. Пробирки с образцами хранили при температуре минус 20°C не более одного месяца.

2.8. Выделение геномной ДНК из крови лабораторных крыс

Выделение геномной ДНК из образцов крови крыс осуществляли с помощью набора реагентов QIAamp DNA Blood mini (Qiagen, Германия) методом сорбции нуклеиновых кислот на спин-колонках Qiagen, с последующей отмывкой спиртовыми растворами и элюцией ДНК в АЕ-буфер (Qiagen, Германия). Процесс выделения ДНК проводили с использованием автоматизированной станции пробоподготовки QIAcube (Qiagen, Германия). Для выполнения методики с помощью дозатора отбирали 200 мкл крови в 2 мл пробирки типа Eppendorf. Далее к каждому образцу добавляли реагенты по схеме, приведенной в инструкции набора QIAamp DNA Blood mini. За один цикл продолжительностью 45 минут проводили выделение 12 образцов ДНК.

У полученных образцов измеряли концентрацию ДНК с использованием спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония). Для этого в программном обеспечении прибора устанавливали необходимый метод анализа:

- режим измерений: Simple Nucleic Acid Quant;
- тип анализируемого образца: dsDNA;
- длина оптического пути 0,7 мм;
- объем исследуемых образцов ДНК – 2 мкл.

Выделенные образцы ДНК разводили буфером АЕ, который использовался в качестве «холостой пробы». Полученные образцы с концентрацией 20 нг/мкл использовали в качестве матрицы для ПЦР-РВ. Пробы хранили при температуре минус 20 °С не более одного месяца.

2.9. Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Анализ полиморфизмов проводили в режиме реального времени с использованием молекулярно-генетического метода специфичекой амплификации участка ДНК на высокопроизводительной станции QuantStudio 12K FlexReal-Time PCR System (Life Technologies, США).

Методика выполнения ПЦР-РВ включала несколько этапов. Вначале проводили подготовку образцов для их дальнейшей амплификации. Для этого в программном обеспечении Sample Tracker Software (LifeTechnologies, США) создавали схемы нанесения образцов ДНК, полученных на этапе выделения. В соответствии с разработанной в программе схемой вносили по 5 мкл каждого образца с концентрацией 20 нг/мкл в 96-луночный ПЦР-планшет. Далее на 384-луночный планшет добавляли по 2,5 мкл смеси для генотипирования TaqMan OpenArray Genotyping MasterMix (Life Technologies, США). Затем из 96-луночного ПЦР-планшета с использованием 12-канального дозатора переносили по 2,5 мкл каждого образца ДНК в 384-луночный планшет. Полученный планшет с реакционной смесью заклеивали алюминиевой фольгой и центрифугировали в течение 5 минут при 3000g.

Далее планшет переносили в раскапывающую станцию Quant Studio 12K Flex Accufill System (Life Technologies, США), где в автоматическом режиме происходило смешивание образцов ДНК со специфичными для анализируемых областей исследуемых генов праймерами и зондами. Дизайн и синтез олигонуклеотидных праймеров, зондов, а также их нанесение на слайд проводилось в компании «Life Technologies Corporation» (Applied Biosystems,

США). После автоматического раскапывания слайда проводили его сборку в течение 90 секунд на специальном штативе.

Подготовленный для проведения ПЦР-РВ слайд помещали в амплификатор Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR System (LifeTechnologies, США). Термоциклирование осуществляли в соответствии с заданной в приборе программой: 95°C – 600 с – 1 цикл; (92°C – 15 с, 60°C – 60 с) – 40 циклов.

После завершения амплификации образцов (3,5 часа) анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для анализа SNPs - TaqMan Genotyper Software (LifeTechnologies, США). Результаты анализа данных генотипирования заносили в текстовом формате в базу данных MSExcel.

2.10. Выделение РНК

2.10.1. Выделение РНК из тканей крыс

Выделение тотальной РНК из образцов головного мозга (гиппокампа) и печени крыс осуществляли с помощью набора реагентов RNeasy Mini (Qiagen, Германия) методом сорбции нуклеиновых кислот на спин-колонках Qiagen, с последующей отмывкой спиртовыми растворами и элюцией РНК в деионизованную воду. Процесс выделения РНК проводили с использованием автоматизированной станции пробоподготовки QIAcube (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией к набору реагентов RNeasy Mini. За один цикл продолжительностью 60 минут проводили выделение 12 образцов РНК.

У полученных образцов измеряли концентрацию РНК с использованием спектрофотометра BioSpec-nano (Shimadzu, Япония). Для этого в программном обеспечении прибора устанавливали необходимый метод анализа:

- режим измерений: Simple Nucleic Acid Quant;
- тип анализируемого образца: RNA;
- длина оптического пути 0,7 мм;
- объем исследуемых образцов РНК – 2 мкл.

Выделенные образцы РНК разводили деионизованной водой, которая использовалась в качестве «холостой пробы» (Qiagen, Германия). Полученные образцы с концентрацией 10 нг/мкл использовали в качестве матрицы для получения кДНК. Пробы хранили при температуре минус 200С не более одного месяца.

2.10.2. Выделение РНК из крови крыс

Для выделения РНК из предварительно обработанных образцов крови использовали методику, основанную на применении реагента для выделения TRI Reagent (MRC, США).

Для проведения стадии лизиса в пробирки типа Eppendorf объемом 2 мл вносили по 150 мкл крови и 700 мкл раствора TRI Reagent и выдерживали в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее для экстракции РНК в пробирки, содержащие лизат, добавляли по 200 мкл хлороформа (MRC, США), перемешивали, выдерживали в течение 15 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 12000g (8 минут) до четкого визуального разделения фаз.

На следующем этапе из пробирок отбирали водную фазу и переносили ее в пробирки типа Eppendorf, в которые затем добавляли по 500 мкл изопропанола (Экохим, Россия). Полученную смесь в пробирках выдерживали при комнатной температуре в течение 10 минут и затем осаждали РНК центрифугированием при 12000g в течение 8 мин.

Полученный после центрифугирования супернатант отбирали и удаляли из каждой пробирки. К оставшемуся на дне пробирок осадку добавляли 1 мл 75 % этанола (Merck, Швейцария) и «промывали» осадок РНК путем перемешивания на вортексе. Для осаждения очищенной РНК снова центрифугировали пробирки с раствором при 7500g в течение 5 минут. Затем отбирали и удаляли полученный супернатант из пробирок. Оставшийся в пробирке осадок РНК высушивали на воздухе в течение 5 минут при комнатной температуре и растворяли в деионизованной воде до концентрации 10 нг/мкл. Полученные растворы хранили

при температуре минус 20 °С не более одного месяца. Образцы выделенной РНК использовали в качестве матрицы для получения комплементарной ДНК (кДНК).

2.11. Получение комплементарной ДНК

Получение кДНК на РНК-матрице осуществляли методом отжига случайных олигонуклеотидов с помощью набора реагентов «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit» (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией, приведенной фирмой-производителем. Суммарный объем реакционной смеси для каждого образца был равен 20 мкл, из которых 4 мкл – проба РНК, 16 мкл – компоненты набора «High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit». Готовую смесь для получения кДНК переносили в 96-луночный планшет, который помещали в амплификатор CFX96 Real-Time System С 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Обратную транскрипцию проводили по следующей программе: 25°С – 10 мин; 37°С – 120 мин; 85°С – 5 мин; 4°С-2 мин.

После проведения амплификации наличие синтезированных фрагментов кДНК подтверждали результатами электрофореза (раздел 2.12). Полученные образцы разбавляли до концентрации 10 нг/мкл буфером АЕ и в дальнейшем использовали их в качестве матрицы для проведения количественной ПЦР-РВ.

2.12. Электрофоретическая детекция комплементарной ДНК

Детекцию синтезированной кДНК проводили с использованием системы автоматического электрофоретического разделения нуклеиновых кислот на микрочипе MultiNA MCE – 202 (Shimadzu, Япония).

Электрофорез выполняли при помощи метода смешивания образца и маркерного раствора «on-chip» с помощью набора реагентов DNA - 12000 Reagent Kit (Shimadzu, Япония). Для визуализации продуктов применяли интеркалирующий краситель SYBR Gold nucleic acid gel stain (Invitrogen, США). В

качестве маркера молекулярных масс использовали размерный стандарт 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb) (New England BioLabs, Великобритания).

После проведения реакции обратной транскрипции образцы кДНК переносили в прибор. В программе MultiNA Control Software (Shimadzu, Япония) выбирали режим измерения DNA-12000 on-chip и проводили детекцию результатов электрофореза. Наличие синтезированных фрагментов кДНК визуализировали по яркому окрашиванию.

2.13. Проведение количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Экспрессию генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1* в образцах крови, тканей головного мозга и печени крыс определяли по отношению к гену эндогенного контроля *18S рРНК* с использованием количественной ПЦР-РВ. Для исследования применяли коммерческие праймеры и зонды, предназначенные для крыс, входящие в состав тест-систем TaqMan Assays (Applied Biosystems, США).

Для проведения количественной ПЦР-РВ готовили реакционную смесь объемом 20 мкл в 96-луночном планшете в соответствии с инструкцией к TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, США). Реакционную смесь перемешивали на вортексе, осаждали капли, переносили по 18 мкл в каждую лунку планшета и добавляли необходимое количество образцов кДНК. Планшет помещали в амплификатор 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Количественную ПЦР проводили по программе: 50°C – 120 с – 1 цикл; 95°C – 600 с – 2 цикла; (95°C – 15 с, 60°C – 60 с) – 50 циклов.

Для каждого образца измерение уровня экспрессии генов проводили в трех повторах. Визуализацию продуктов амплификации проводили автоматически в режиме реального времени. Анализ данных проводили с использованием программы RQ Manager v.1.2.1.

2.14. Методика оценки относительного уровня экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1*

Уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1* оценивали путем измерения уровня мРНК для каждого гена индивидуально по каждому животному с использованием значений флюоресценции продуктов количественной ПЦР-РВ путем подсчета числа циклов ПЦР, необходимых для достижения заданного уровня пороговой флюоресценции.

Для определения исходного количества ДНК использовали значения порогового цикла амплификации (C_t) и значения логарифма концентрации матрицы ($\log C$). Величину C_t для каждого образца определяли, как цикл, при котором линия флюоресценции образца пересекала пороговую линию.

Для расчета относительного количества кДНК, соответствующего относительному количеству мРНК в анализируемом образце, использовали метод построения калибровочного графика в координатах C_t – $\log C$ с серией разведения пулированных образцов исследуемой кДНК. Из этого графика находили концентрацию ДНК-матрицы в исследуемых образцах. Калибровочные кривые строили для каждого определяемого гена-мишени.

Показатель уровня экспрессии гена определяли относительно гена-рефери (эндогенного контроля) по следующей формуле:

$$УЭ = \frac{\text{количество мРНК определяемого гена}}{\text{количество мРНК гена-рефери}} * 100\%$$

в которой УЭ – относительный уровень экспрессии гена [144].

2.15. Методы статистической обработки результатов исследований

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Statistica 8.0 и SPSS 13.0. Для сравнения групп по качественным признакам применяли критерий χ^2 – Пирсона или точный критерий Фишера. Количественные признаки между двумя группами сравнивали с использованием

непараметрического U-теста Манна-Уитни, между тремя и более группами – теста Крускала-Уоллиса, результаты представляли в виде Median 25%-75%. При проверке статистических гипотез результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Исходя из этого ассоциацию между степенью угнетения функционирования ЦНС и генотипом определяли с помощью критерия χ^2 – критерия Пирсона (при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса, либо двусторонний точный критерий Фишера), сравнивая распределение генотипов по каждому полиморфизму между группами. Относительный риск развития степени угнетения ЦНС по конкретному генотипу вычисляли как «отношение шансов» (OR-odds ratio). Значения отношения шансов с 95% доверительным интервалом рассчитывали используя он-лайн программу «Калькулятор для расчета отношения шансов» [203]. Значение OR = 1 рассматривали как отсутствие ассоциации, OR > 1 — как положительную ассоциацию (повышенный риск развития степени угнетения ЦНС), OR < 1 — как отрицательную ассоциацию (пониженный риск развития степени угнетения ЦНС).

Сравнение уровней экспрессии в группах животных осуществляли с использованием критерия Крускала-Уоллиса и U-теста Манна Уитни. Множественное сравнение показателей проводили с применением критерия Данна.

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА, ПРИ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

Анализ литературных данных подтверждает существование биологически обусловленных различий в отношении к алкоголю, толерантности и чувствительности к нему, что играет большую роль в формировании алкогольных отравлений [17, 19]. Большое значение при прогнозе течения алкогольной интоксикации придается индивидуальным, генетически детерминированным особенностям организма. В ряде экспериментальных исследований отмечается, что вариабельность развития эффектов организма в ответ на действие этанола может быть обусловлена уровнем экспрессии генов [25, 26, 190].

3.1. Определение токсикометрического параметра этанола у исследуемых животных

В работе в качестве токсикометрического параметра этанола был выбран один из наиболее широко применяемых показателей опасности ядовитых и умеренно-токсичных веществ – среднесмертельная доза (ЛД₅₀), которая представляет собой наиболее точную количественную характеристику токсичности вещества с минимальным значением 95% доверительного интервала и несомненным оцениваемым эффектом (гибель животного) [27, 35].

По данным, приведенным в диссертации Д.С. Лисицкого, токсикометрические параметры этанола у крыс, включая дозу ЛД₅₀, могут варьировать и колебаться в значительных пределах [27]. Так, по одним данным, среднесмертельная доза этилового спирта для разных видов животных (в том числе крыс) при пероральном поступлении находится на уровне 4 – 8 г/кг, а по другим – может достигать 12 г/кг [1, 27, 34].

Учитывая этот факт, было проведено определение среднесмертельной дозы этанола для каждой партии поступивших экспериментальных животных, использованных в работе.

В таблице 8 приведены данные летальности крыс в первые сутки после внутрибрюшинного введения этанола в диапазоне исследованных доз.

Таблица 8 – Токсичность этанола при внутрибрюшинном введении интактным и предварительно алкоголизованным крысам-самцам (г/кг)

Доза, г/кг	Количество животных (погибших/ общее число животных в группе)	
	1-я партия	2-я партия
5,0	0/3	0/3
6,3	2/3	1/3
7,9	3/3	2/3
10,0	3/3	2/3

Признаки интоксикации этанолом носили дозозависимый характер и проявлялись в прогрессирующем угнетении функций ЦНС с нарастающими расстройствами витальных функций (дыхания, кровообращения). Токсичность этанола (LD_{50}) определяли «табличным экспресс-методом» по В.Б. Прозоровскому.

Таким образом, среднесмертельные дозы (LD_{50}) рассчитанные на 1 сутки составили: $6,31 \pm 0,49$ г/кг и $6,61 \pm 0,64$ г/кг для двух групп животных, использованных в экспериментах.

Для моделирования острой интоксикации этанолом был выбран внутрибрюшинный путь введения 33% этанола в дозе $0,8 LD_{50}$, составившей для каждой партии 5,1 г/кг и 5,3 г/кг. Это позволило стандартизировать схему введения и уменьшить разброс клинических проявлений интоксикации [1].

3.2. Экспериментальная оценка выраженности острого отравления этанолом у животных

Этанол, являясь нейротоксикантом, оказывает депримирующее действие на ЦНС. Проявлением депримирующего действия является развитие коматозных состояний различной степени тяжести: оглушение, сопор, умеренная кома, терминальная кома, глубокая кома, летальный исход [1].

Сложность диагностики и прогнозирования степени угнетения ЦНС являются причиной высокой летальности среди отравленных этанолом. В связи с этим в данной работе было проведено моделирование острого алкогольного отравления на животных для выявления возможной связи изменения поведенческих и неврологических показателей (от физиологической нормы до глубокого угнетения ЦНС, а также последующего, визуально оцениваемого, восстановления состояния животных) с молекулярно-генетическими особенностями ГАМК_A-рецептора.

Оценку выраженности острого отравления этанолом крыс, получивших дозу этанола 0,8 ЛД₅₀, (как на фоне предшествующей алкогольной интоксикации, так и без нее) проводили с использованием математической модели, разработанной В.А. Башариным (раздел 2.6).

Определение значений индекса тяжести неврологических нарушений (ИТНН) у животных после внутрибрюшинного введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀ проводили на двух этапах. На первом этапе (через 3 часа после введения этанола) наблюдали и регистрировали изменение поведенческих и неврологических показателей от физиологической нормы до глубокого угнетения ЦНС. На втором этапе (через 8 часов после введения этанола) фиксировали восстановление состояния животных до достижения уровня физиологической нормы.

В таблице 9 на основании рассчитанных значений ИТНН приведено распределение состояний у крыс, с острым отравлением этанолом и отравлением этанолом на фоне предшествующей алкогольной интоксикации, спустя 3 и 8

часов после внутрибрюшинного введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Определение ИТНН проводилось у каждого животного, взятого в эксперимент.

Таблица 9 – Распределение состояний у крыс с острым отравлением этанолом и отравлением этанолом на фоне предшествующей алкогольной интоксикации спустя 3 и 8 часов после внутрибрюшинного введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀

Группа животных	Время наблюдения после введения этанола в дозе 0,8 ЛД ₅₀ , ч	Количество животных, характеризующихся разными физиологическими состояниями*						
		1	2	3	4	5	6	7
Крысы, подвергшиеся острому отравлению (n=100)	3	0	0	11	78	8	0	3
	8	38	43	11	2	0	0	6
Крысы, подвергшиеся острому отравлению на фоне предварительной алкоголизации (n=55)	3	1	2	0	6	23	4	19
	8	3	0	2	0	6	2	42

Примечание: n – количество животных; * физиологические состояния: 1 – физиологическая норма, 2 – оглушение, 3 – сопор, 4 – поверхностная кома, 5 – глубокая кома, 6 – терминальная кома, 7 – летальный исход

Данные, представленные в таблице 9 и на рисунке 5, демонстрируют, что острое отравление этанолом приводило к формированию разной картины исхода интоксикации в группах у крыс с острым отравлением этанолом и отравлением этанолом на фоне предшествующей алкогольной интоксикации.

Через 8 часов после острого отравления этанолом у хронически алкоголизованных животных было зарегистрировано большее количество случаев «летального исхода» – 76%, чем у крыс, перенесших острое отравление без предварительной алкоголизации – 6% (рисунок 5, Г и Б, соответственно). Полученные результаты согласуются с клиническими наблюдениями, выявленными в ряде научных экспериментов. В одной из таких работ, было показано, что хронический алкоголизм существенно отягощал течение острых

отравлений этанолом у больных, в связи с наличием более выраженных метаболических расстройств [66]. Другое исследование, проведенное на крысах, также позволило выявить увеличение выраженности и продолжительности поведенческих нарушений животных после острого отравления этанолом на фоне предварительной алкоголизации [204].

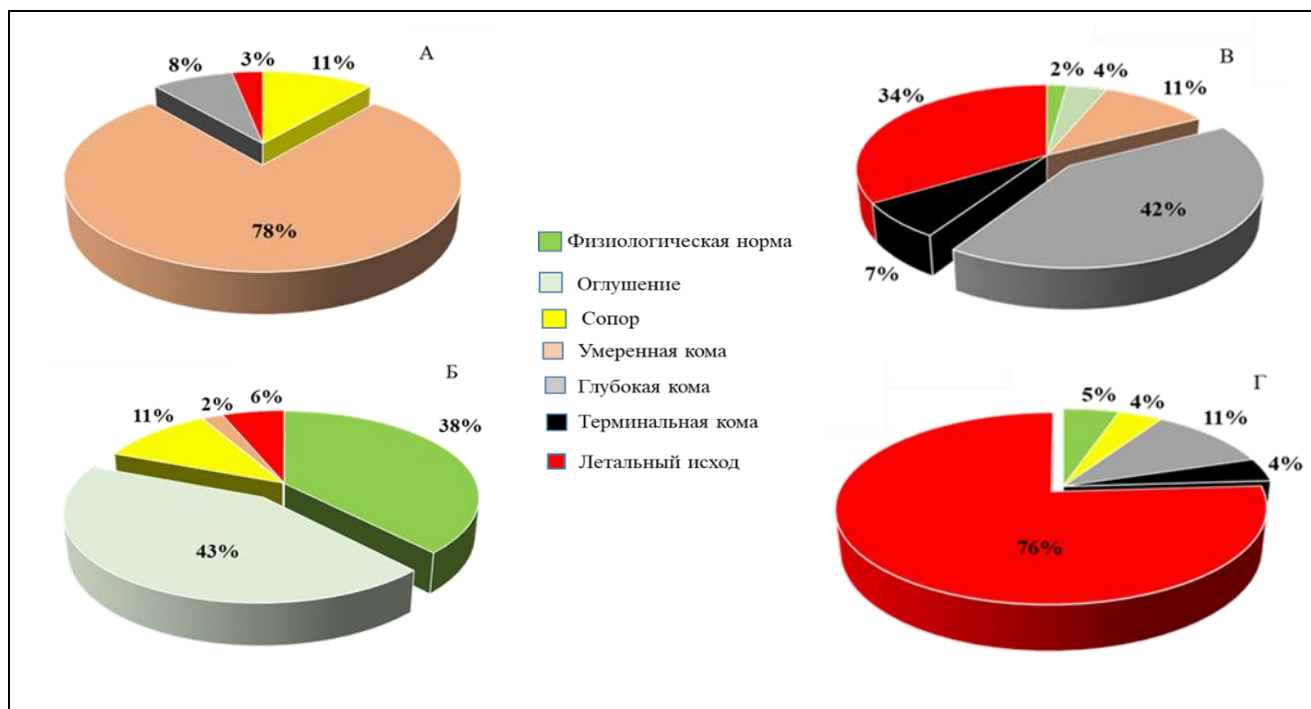


Рисунок 5 – Относительное количество животных, перенесших острое отравление без предварительной алкоголизации (А, Б) и перенесших острое отравление на фоне предварительной алкоголизации (В, Г), характеризующихся разными физиологическими состояниями спустя 3 и 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, %

Данные результаты свидетельствуют о наличии разных клинических проявлений после острого отравления животных без предварительной алкоголизации и острого отравления этанолом крыс на фоне предшествующей алкогольной интоксикации. Учитывая полученный вывод, целесообразным является изучение и выявление молекулярно-генетических маркеров, которые оказывают влияние на степень тяжести интоксикации этанолом при остром отравлении токсикантом как на фоне предварительной алкоголизации, так и без нее.

3.3. Изучение влияния острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* в образцах тканей лабораторных животных

В ряде исследований отмечается, что воздействие этанолом приводит к изменению уровней экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, что в конечном итоге влияет на восприимчивость к интоксикации [173, 174, 179]. Однако данные, приведенные в литературном обзоре, об изменении экспрессии генов в тканях экспериментальных животных после отравления этанолом, довольно противоречивы. По этой причине существует необходимость в проведении дополнительных исследований, а также изучении влияния этанола на экспрессию этих генов в образцах тканей крыс. В связи с этим в данном разделе были изучены особенности экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* после острой и хронической интоксикации этанолом экспериментальных животных.

В ходе проведенных исследований у животных экспериментальных групп №1 – №4 (раздел 2.5) был рассчитан показатель уровня экспрессии исследуемого гена согласно формуле, приведенной в разделе 2.14. В качестве эндогенного контроля необходимо было выбрать ген, экспрессия которого не изменялась в условиях эксперимента. В качестве референс-гена в данной работе было предложено использовать ген рибосомальной *18s pPНК*, относящийся к числу генов «домашнего хозяйства». Для проверки возможности использования выбранного гена в качестве гена-рефери была проведена количественная оценка уровней экспрессии гена *18s pPНК*, путем сравнения значений *Ct* (номера цикла, на котором флуоресцентный сигнал реакции пересекает порог) для животных четырех экспериментальных групп №1 – №4 (рисунок 6).

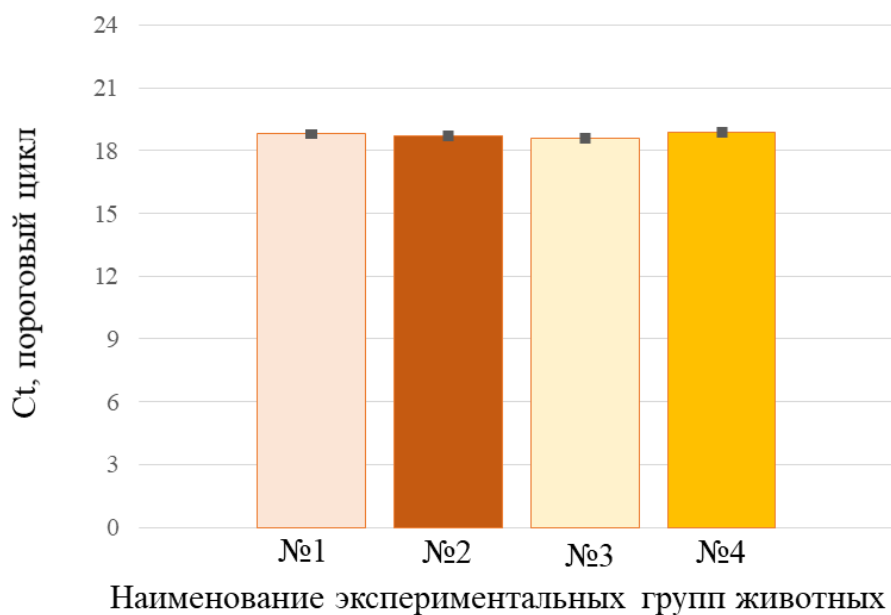


Рисунок 6 – Значения порогового цикла амплификации гена *18s pPNC* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Как видно из представленных данных, отличия *Ct* у животных разных экспериментальных групп не превышали 0,5, что соответствовало требованиям, предъявляемым к референс-генам [146]. Таким образом, экспрессия *18s pPNC* не зависела от воздействия токсиканта и не изменялась в условиях эксперимента. Полученные данные позволили использовать ген *18s pPNC* в качестве референс-гена для сравнения генной экспрессии у животных после острой и хронической интоксикации этанолом.

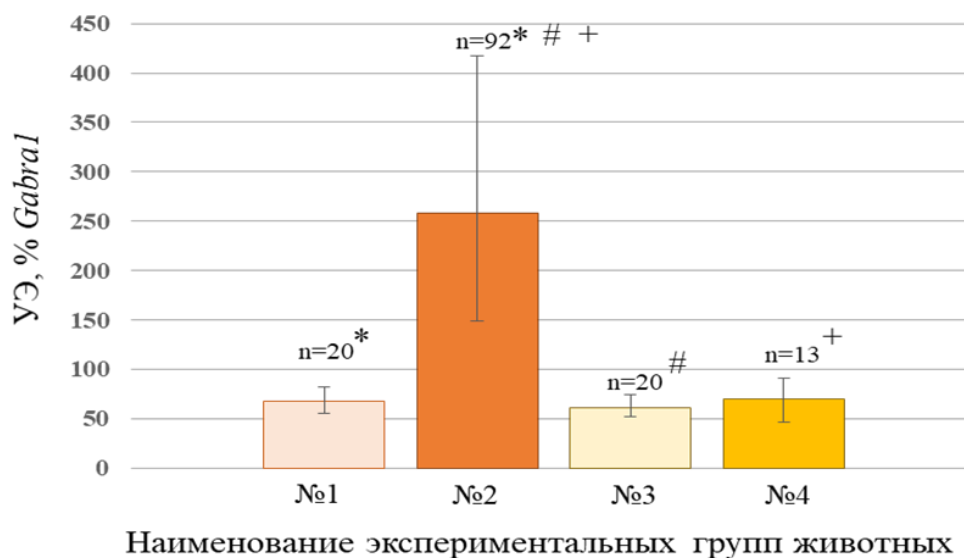
В результате проведенных исследований в образцах крови и печени у всех экспериментальных животных не было выявлено экспрессии изучаемых генов. В тоже время в образцах головного мозга была выявлена экспрессия всех исследуемых генов – *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1*, за исключением гена *Gabra6*. Проведенный анализ полученных результатов позволил выявить, что у крыс значения УЭ варьировались в зависимости от гена и экспериментальной группы. При этом достоверное ($p < 0,05$) общее межгрупповое различие уровней экспрессии было выявлено для генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* (таблица 10).

Таблица 10 – Относительный уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* в головном мозге исследуемых крыс, Me (25; 75 percentile)

Ген	Относительный уровень экспрессии (УЭ, %) в экспериментальных группах				p
	№1	№2	№3	№4	
<i>Gabra1</i>	68,2 [55,7-82,3] (n=20)	258,5 [149,2-417,4] (n=92)	61,3 [52,8-74,2] (n=20)	70,5 [46,3-91,5] (n=13)	0,000*
<i>Gabra2</i>	105,2 [83,3-303,1] (n=20)	75,2 [44,3-166,1] (n=85)	78,4 [62,1-96,3] (n=20)	84,7 [74,6-103,5] (n=13)	0,074
<i>Gabra3</i>	79,5 [56,8-89,1] (n=20)	55,2 [28,4-132,6] (n=81)	89,1 [68,7-96,3] (n=20)	102,4 [63,7-121,2] (n=13)	0,081
<i>Gabra4</i>	58,2 [40,1-80,5] (n=20)	373,7 [212,2-593,6] (n=83)	52,3 [35,4-78,5] (n=20)	84,3 [76,1-91,5] (n=13)	0,000*
<i>Gabra5</i>	165,8 [72,4-183,2] (n=20)	42,7 [8,1-237,2] (n=86)	32,2 [18,1-67,4] (n=20)	279,3 [198,2-353,7] (n=13)	0,001*
<i>Gabrb1</i>	80,4 [58,2-89,6] (n=20)	138,6 [75,5-326,4] (n=92)	50,3 [43,6-52,1] (n=20)	83,2 [56,1-145,6] (n=13)	0,000*

Примечание: p – статистическая значимость отличий; * статистически достоверные различия между группами;

Для установления различий УЭ генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* между группами животных использовали критерий Данна. С учетом межгруппового сравнения показателей для гена *Gabra1* статистические различия были зафиксированы между следующими группами животных: №1 – №2; №2 – №3; №2 – №4 (рисунок 7). Уровни значимости различий УЭ гена *Gabra1* в головном мозге между группами животных представлены в таблице 11.



*, #, + – статистически значимые различия показателя между соответствующими группами животных; n–количество животных в группе

Рисунок 7 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra1* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Таблица 11 – Результаты множественного сравнения относительного уровня экспрессии гена *Gabra1* в головном мозге крыс между группами животных с использованием критерия Данна

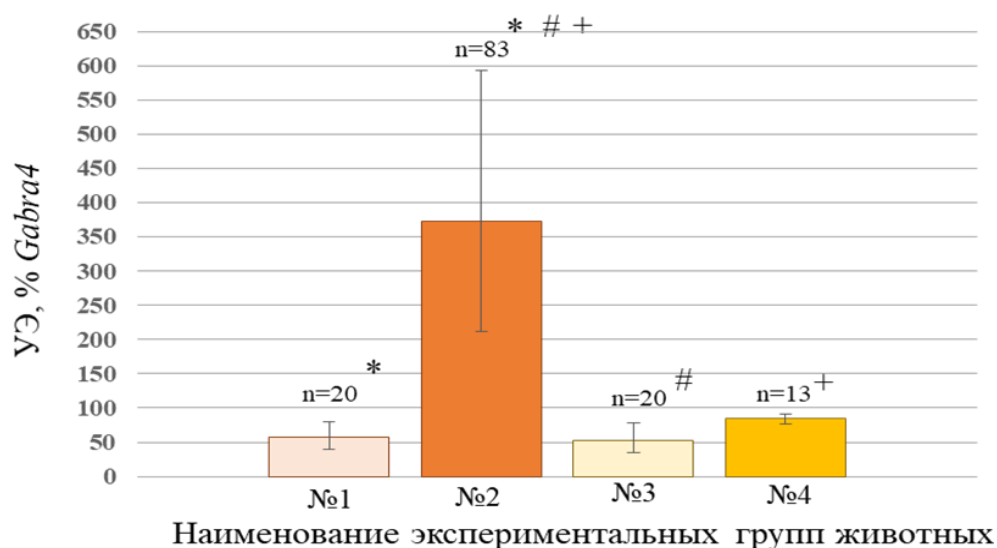
Группа животных	Уровень значимости различий между группами ...			
	№1	№2	№3	№4
№1	-	0,000*	1,000	1,000
№2	0,000*	-	0,000*	0,000*
№3	1,000	0,000*	-	1,000
№4	1,000	0,000*	1,000	-

Примечание: * – статистически достоверные различия между группами

Анализ результатов, представленных на рисунке 7 и в таблице 11, показал, что у крыс после острого отравления этанолом отмечалось значимое увеличение уровня экспрессии гена *Gabra1* в 3,8 раза.

Кроме того, выявлено, что в группах предварительно алкоголизованных животных (№3 и №4) уровни экспрессии гена *Gabra1* были ниже (в 4 и 3,6 раза, соответственно), чем в группе крыс после острого отравления этанолом.

Схожие закономерности (рисунок 8) обнаружены при расчете УЭ гена *Gabra4*. Анализ межгрупповых различий уровней экспрессии (таблица 12) позволил установить достоверное увеличение (в 6,5 раз) УЭ гена *Gabra4* после острой интоксикации этанолом крыс. В то же время выявленные значения уровней экспрессии в группах предварительно алкоголизованных животных (№3 и №4) были ниже (в 7 и 4,4 раза, соответственно), чем в группе крыс после острого отравления этанолом.



*, #, + – статистически значимые различия показателя между соответствующими группами животных; n – количество животных в группе

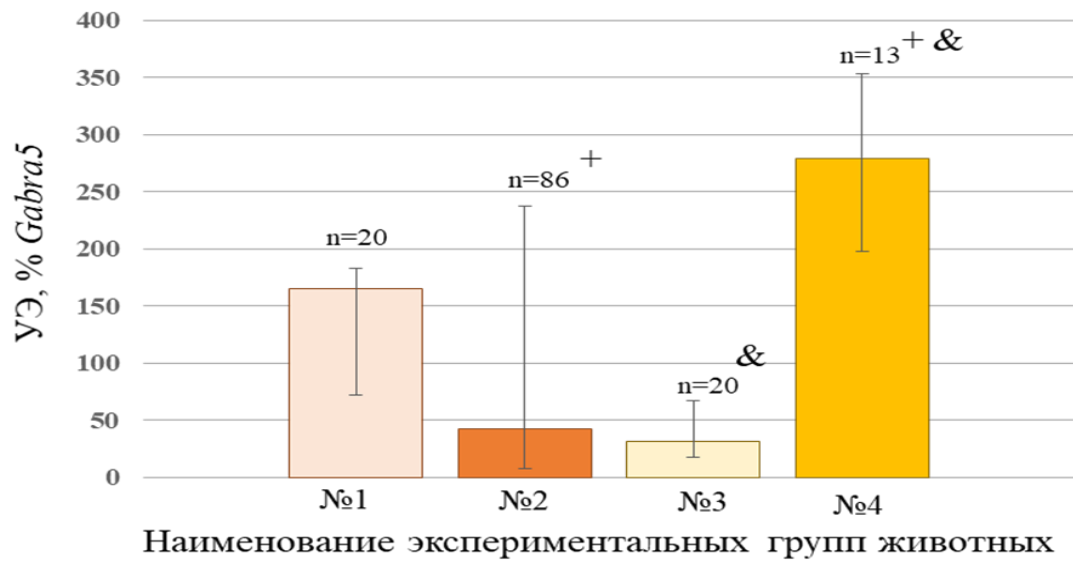
Рисунок 8 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra4* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Таблица 12 – Результаты множественного сравнения относительного уровня экспрессии гена *Gabra4* в головном мозге крыс между группами животных с использованием критерия Данна

Группа животных	Уровень значимости различий между группами ...			
	№1	№2	№3	№4
№1	-	0,000*	1,000	1,000
№2	0,000*	-	0,000*	0,000*
№3	1,000	0,000*	-	1,000
№4	1,000	0,000*	1,000	-

Примечание: * – статистически достоверные различия между группами

Для гена *Gabra5* достоверные отличия уровней экспрессии были получены для следующих групп: №2 – №4; №3 – №4 (рисунок 9, таблица 13).



+, & – статистически значимые различия показателя между соответствующими группами животных; n–количество животных в группе

Рисунок 9 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra5* в головном мозге экспериментальных групп животных, Me (25; 75 percentile)

Таблица 13 – Результаты множественного сравнения относительного уровня экспрессии гена *Gabra5* в головном мозге крыс между группами животных с использованием критерия Данна

Группа животных	Уровень значимости различий между группами ...			
	№1	№2	№3	№4
№1	-	0,228	0,104	1,000
№2	0,228	-	1,000	0,008*
№3	0,104	1,000	-	0,005*
№4	1,000	0,008*	0,005*	-

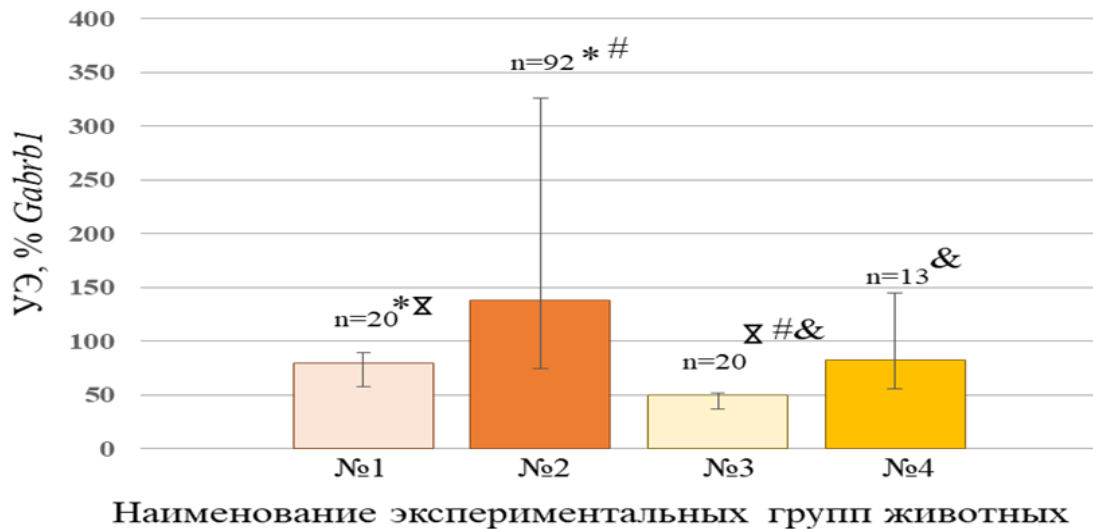
Примечание:* – статистически достоверные различия между группами

Анализ результатов, представленных на рисунке 9 показал, что у хронически алкоголизированных крыс после острого воздействия этанола происходило достоверное увеличение (в 8,7 раза) уровня экспрессии гена *Gabra5*.

Кроме того, после острого отравления этанолом уровень экспрессии гена *Gabra5* был намного выше (в 6,6 раза) в головном мозге предварительно

алкоголизированных крыс, чем у животных, перенесших острое отравление этанолом без предварительной алкоголизации.

Результаты анализа УЭ гена *Gabrb1* в образцах головного мозга белых беспородных крыс представлены на рисунке 10 и таблице 14.



&, #, X – статистически значимые различия показателя между соответствующими группами животных; n–количество животных в группе

Рисунок 10 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Таблица 14 – Результаты множественного сравнения относительного уровня экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс между группами животных с использованием критерия Данна

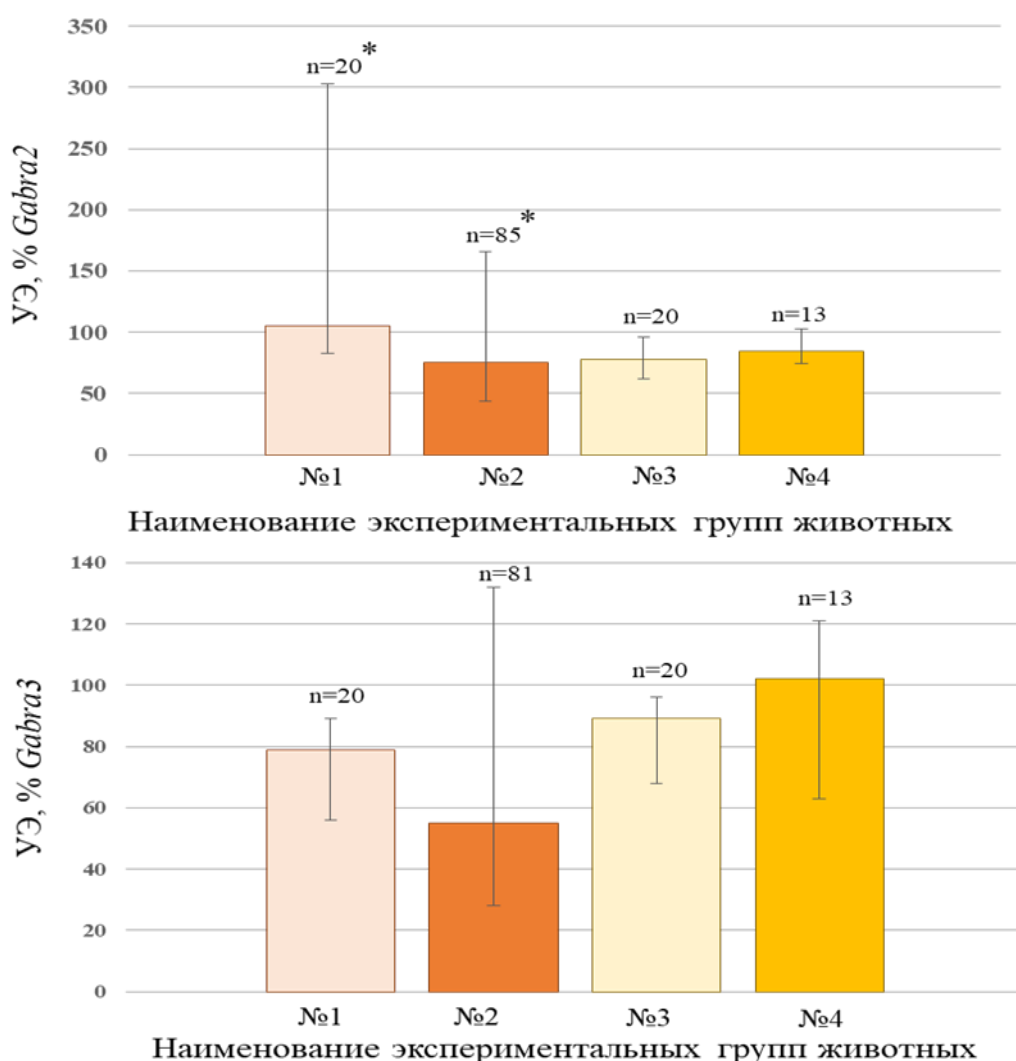
Группа животных	Уровень значимости различий между группами ...			
	№1	№2	№3	№4
№1	-	0,050*	0,027*	1,000
№2	0,050*	-	0,000*	0,694
№3	0,027*	0,000*	-	0,015*
№4	1,000	0,694	0,015*	-

Примечание – * – статистически достоверные различия между группами

Согласно полученным данным, уровень экспрессии гена *Gabrb1* после острой интоксикации крыс как на фоне предшествующей алкогольной интоксикации, так и без нее увеличился (примерно в 1,7 раза). Также было

обнаружено, что хроническая алкоголизация крыс в течение 1 месяца приводила к достоверному снижению (в 1,6 раза) УЭ гена *Gabrb1* в головном мозге животных. Кроме того, при сравнении уровня экспрессии групп №2 и №3 было установлено, что крысы, после острого отравления имели значение УЭ гена *Gabrb1* (в 2,8 раза) больше, по сравнению с хронически алкоголизированными крысами.

Различия уровней экспрессии для генов *Gabra2* и *Gabra3* после острого и длительного воздействия этанолом на животных не достигали минимального уровня значимости (рисунок 11). Тем не менее хотелось бы отметить, что для гена *Gabra2* была установлена тенденция ($p=0,085$) к снижению уровня экспрессии (в 1,4 раза) в головном мозге крыс после острого воздействия этанола (таблица 15).



n–количество животных в группе

Рисунок 11 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra2* и *Gabra3* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Таблица 15 – Результаты множественного сравнения относительного уровня экспрессии гена *Gabra2* в головном мозге крыс между группами животных с использованием критерия Данна

Группа животных	Уровень значимости различий между группами ...			
	№1	№2	№3	№4
№1	-	0,085	0,140	1,000
№2	0,085	-	1,000	1,000
№3	0,140	1,000	-	1,000
№4	1,000	1,000	1,000	-

Примечание – * – статистически достоверные различия между группами

В результате проведенных исследований установлено достоверное изменение уровней экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1*. Таким образом, можно предположить, что в патогенетических механизмах защитных реакций ГАМК-ергической системы, как при острой, так и хронической интоксикациях этанолом, принимают участие α_1 -, α_4 -, α_5 - и β_1 -субъединицы ГАМК_A-рецептора. Вместе с тем необходимо отметить, что изменение (увеличение или снижение) уровня экспрессии генов зависело от модели интоксикации, приводящей к разным ответам ГАМК-ергической системы.

Острое отравление крыс приводило к увеличению экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* – в 3,8, 6,5 и 1,7 раза, соответственно. В то же время было установлено, что острое отравление предварительно алкоголизированных крыс вызывало увеличение УЭ генов *Gabra5* и *Gabrb1* – в 8,7 и 1,7 раза, соответственно. Кроме того, для генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* было обнаружено, что значение уровней экспрессии были выше в головном мозге крыс, перенесших острое отравление по сравнению с животными, употреблявшими этанол в течение 1 месяца. Также повышенные значения УЭ для генов *Gabra1* и *Gabra4* были выявлены в головном мозге крыс, перенесших острое отравление этанолом без предварительной алкоголизации, по сравнению с крысами, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации. Для гена *Gabra5* после острого отравления животных (не подвергшихся предшествующей

алкоголизации), напротив, установлено меньшее значение УЭ в головном мозге крыс, чем у предварительно алкоголизованных животных. В отношении длительного воздействия этанола регистрировали достоверное снижение (в 1,6 раза) уровня экспрессии гена *Gabrb1*.

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что острая и хроническая интоксикация этанолом приводит к формированию разных ответных реакций со стороны ГАМК-ергической системы. Острое отравление этанолом у крыс (как на фоне предварительной алкоголизации так и без нее) приводит к увеличению уровней экспрессии разных генов. Причем максимальные статистические различия были получены на модели острого отравления предварительно алкоголизованных крыс.

Сопоставление изменений уровней экспрессии генов позволяет сделать вывод о том, что значимое увеличение УЭ генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* может вызывать активацию ГАМК_A рецепторного комплекса в ответ на острое отравление этанолом. В тоже время зафиксированное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1* после хронической алкоголизации, вероятно, приводит к ослаблению ГАМК-ергической передачи и общему снижению активности ГАМК-ергической системы при длительном употреблении алкоголя.

Таким образом, определение относительного уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, имеет несомненное значение при изучении как острой, так и хронической интоксикации этанолом. Полученные результаты могут являться критериями токсического действия этанола, а изменения в УЭ исследуемых генов предположительно лежат в основе формирования разных степеней тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему организма. В связи с этим на следующем этапе нашей работы мы сопоставили уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* со степенью депримирующего действия этанола на организм крыс.

3.4. Выявление связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола

Принимая во внимание выявленное изменение уровней экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* при остром и хроническом воздействии этанола, представлялось целесообразным исследовать связь показателей УЭ генов с выраженностью острого отравления этанолом без предварительной алкоголизации животных и на фоне нее. Уровень экспрессии исследуемых генов определяли в головном мозге крыс спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Поиск связи осуществляли между состоянием (определенным по критерию ИТНН спустя 8 часов после отравления) выживших животных и соответствующими показателями уровня экспрессии генов.

3.4.1. Выявление связи уровня экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* со степенью депримирующего действия этанола на модели острой интоксикации этанолом крыс

В данной части работы проводили исследования по оценке влияния УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* в образцах головного мозга выживших крыс, перенёсших острое отравление этанолом, со степенью депримирующего действия этанола. Через 8 часов после острого воздействия этанолом показатель уровня экспрессии исследуемых генов в головном мозге крыс варьировал в широком диапазоне в зависимости от индекса тяжести неврологических нарушений. Состояние выживших животных в соответствии с бальной системой ИТНН относилось к одному из следующих неврологических статусов:

- 1 - «физиологическая норма»;
- 2 - «оглушение»;
- 3 - «сопор»;
- 4 - «умеренная кома».

Состояний, соответствующих статусам «глубокой комы», «терминальной комы» и «летальному исходу» спустя 8 часов, после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, интактным крысам не было зарегистрировано (таблица 16).

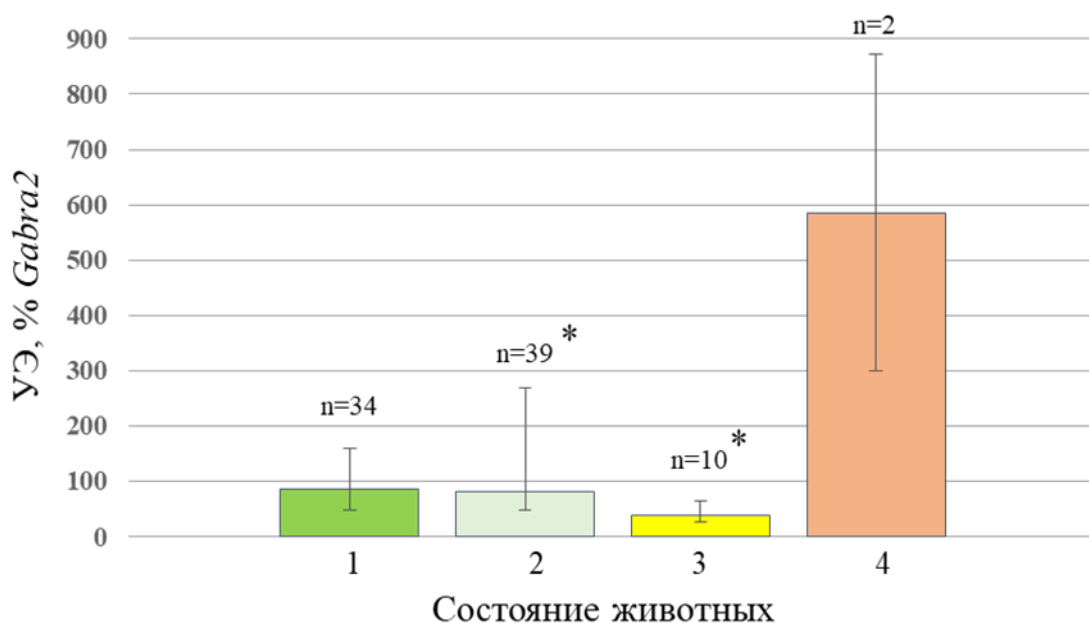
Таблица 16 - Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему крыс спустя 8 часов после воздействия токсикантом, Me (25; 75 percentile)

Ген	Относительный уровень экспрессии гена (УЭ), %				p
	Физиологическая норма	Оглушение	Сопор	Умеренная кома	
<i>Gabra1</i> (n=92)	256,1 [136,5-325,3]	260,4 [158-591]	142,3 [109,5-294,2]	2111,9 [100,2-4123,8]	0,305
<i>Gabra2</i> (n=85)	86,2 [47,6-159,2]	80,4 [47,3-269,2]	39,3 [26,5-64,7]	585,3 [300,3-872,2]	0,011*
<i>Gabra3</i> (n=81)	42,4 [28,3-192,1]	72,3 [40,1-202,5]	24,6 [16,2-48,3]	55,0 [55,0-55,0]	0,112
<i>Gabra4</i> (n=83)	432,1 [212,4-1304,6]	342,4 [248,2-539,3]	204,2 [103,3-494,5]	988,1 [208,3-1767,4]	0,169
<i>Gabra5</i> (n=86)	90,5 [8,1-387,2]	30,3 [7,1-345,2]	15,1 [4,1-40,6]	61,5 [33,2-89,4]	0,307
<i>Gabrb1</i> (n=92)	279,2 [118,5-784,6]	154,5 [78,2-237,3]	44,3 [30,2-61,7]	59,3 [45,1-73,6]	0,000*

Примечание: * статистически достоверные различия между группами; n-всего животных; p-статистическая значимость

Из данных, представленных в таблице 16, видно, что общее межгрупповое различие уровней экспрессии генов было выявлено для генов *Gabra2* и *Gabrb1* ($p < 0,05$). Однако уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabra5* в головном мозге животных, состояние которых характеризовалось разными значениями критерия ИТНН («физиологическая норма»/«оглушение»/«сопор»/«умеренная кома»), спустя 8 часов после острого отравления этанолом значимо не отличался ($p > 0,05$).

Для установления различий УЭ генов *Gabrb1* и *Gabra2* между группами животных, состояние которых относилось к одному из неврологических статусов, указанных в таблице 16, использовали критерий Данна. Для гена, кодирующего α_2 -субъединицу ГАМК_A-рецептора, с учетом межгруппового сравнения показателей УЭ, установлено достоверное ($p=0,033$) снижение (в 2 раза) уровня экспрессии в головном мозге крыс, состояние которых относилось к «сопору», по сравнению с крысами, состояние которых описывалось, как «оглушение» (рисунок 12).

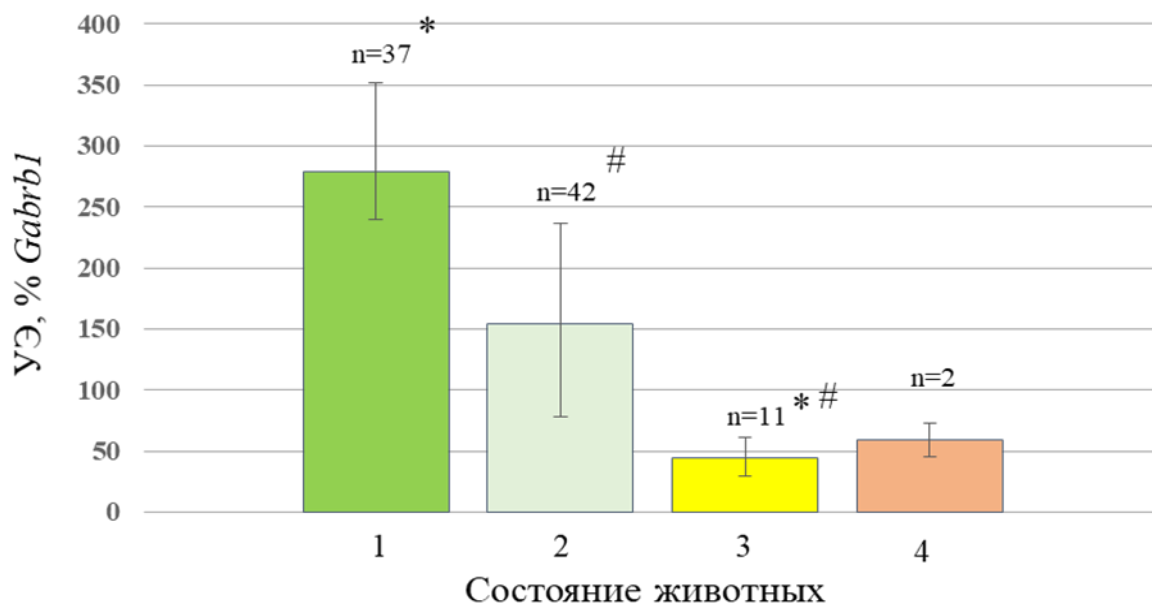


* – статистически значимые различия показателя между группами животных;
n–количество животных в группе

Рисунок 12 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra2* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Для гена *Gabrb1*, используя множественное сравнение относительного уровня экспрессии гена, было установлено, что уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс, характеризующихся неврологическим статусом «норма», был выше в 6 раз по сравнению с особями, состояние которых относилось к «сопору».

Кроме того, показатель УЭ был достоверно выше (в 3,5 раза) в группе животных с показателем ИТНН «оглушение», по сравнению с животными из группы с состоянием «сопор» (рисунок 13).



*, # – статистически значимые различия показателя между группами животных; n – количество животных в группе

Рисунок 13 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Таким образом, связь уровня экспрессии с выраженностью депримирующего действия этанола у крыс, перенесших острое отравление, была выявлена для генов, кодирующих α_2 - и β_1 -субъединицы ГАМК_A-рецептора. Обнаруженная связь выявлена для данных неврологического тестирования глубины депримации через 8 часов после введения этанола в дозе 0,8ЛД₅₀. Утяжеление клиники интоксикации у крыс было связано со снижением уровней экспрессии генов *Gabra2* и *Gabrb1*.

3.4.2. Выявление связи уровня экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* со степенью депримирующего действия этанола на модели острой интоксикации этанолом предварительно алкоголизованных крыс

На следующем этапе устанавливали связь УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* в образцах головного мозга предварительно алкоголизованных крыс, со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после острого отравления животных. В таблице 17 приведены

значения УЭ исследуемых генов в образцах головного мозга предварительно алкоголизованных крыс в зависимости от тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀.

Таблица 17 - Относительный уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* в зависимости от тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему предварительно алкоголизованных крыс спустя 8 часов после воздействия токсикантом, Me (25; 75 percentile)

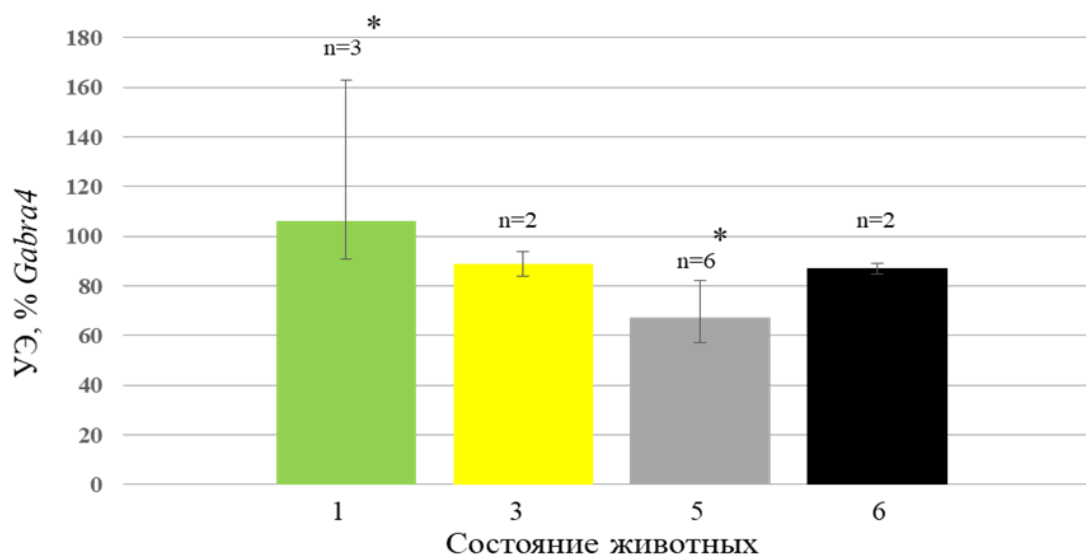
Ген	Относительный уровень экспрессии гена (УЭ), %				p
	Физиологическая норма	Сопор	Глубокая кома	Терминальная кома	
<i>Gabra1</i> (n=13)	103,2 [50,4-119,7]	81,4 [70,2-91,7]	55,4 [46,6-70,7]	59,7 [46,4-72,8]	0,295
<i>Gabra2</i> (n=13)	90,1 [84,6-113,9]	103,2 [71,5-136,2]	78,2 [74,6-85,4]	81,2 [59,4-103,6]	0,683
<i>Gabra3</i> (n=13)	102,3 [52,4-173,6]	78,5 [63,4-94,8]	97,5 [60,6-109,3]	134,4 [121,5-147,8]	0,523
<i>Gabra4</i> (n=13)	106,6 [91,2-163,7]	89,7 [84,4-94,6]	67,1 [57,5-82,8]	87,4 [85,2-89,3]	0,018*
<i>Gabra5</i> (n=13)	43,5 [32,4-390,7]	416,5 [279,4-553,5]	296,4 [199,2-353,5]	210,4 [203,5-217,7]	0,434
<i>Gabrb1</i> (n=13)	141,4 [62,7-310,2]	160,7 [121,4-200,8]	59,4 [45,5-145,4]	68,7 [54,8-82,9]	0,513
Примечание: * статистически достоверные различия между группами; n-всего животных; p-статистическая значимость					

Как следует из данных, представленных в таблице 17, значения УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* различались в зависимости от глубины депримации. Состояние выживших животных описывалось одним из следующих неврологических статусов:

- 1 – «физиологическая норма»;
- 3 – «сопор»;

- 5 – «глубокая кома»;
- 6 – «терминальная кома».

В ходе оценки тяжести неврологических нарушений у предварительно алкоголизованных крыс, спустя 8 часов после острого введения этанола, состояния «оглушение» и «умеренная кома» у исследуемых животных не были зарегистрированы. На основании проведенного анализа данных (таблица 17) для генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra5* и *Gabrb1* было выявлено, что различия их уровней экспрессии у животных, характеризующихся разными состояниями («физиологическая норма»/«сопор»/«глубокая кома»/«терминальная кома») не являются статистически значимыми ($p > 0,05$). Статистически значимые межгрупповые различия ($p = 0,018$) показателя УЭ спустя 8 часов после острого отравления этанолом были выявлены для гена *Gabra4* (таблица 17). Используя критерий Данна для множественного сравнения показателей, установлено что УЭ гена *Gabra4* в головном мозге животных с показателем ИТНН, соответствующем «глубокой коме» был (в 1,6 раза) ниже, чем у животных, состояние которых относилось к «физиологической норме» (рисунок 14).



* – статистически значимые различия показателя между группами животных;
n – количество животных в группе

Рисунок 14 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra4* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 percentile)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что степень выраженности патологических процессов при острой и хронической интоксикации сопряжены с генетическими особенностями ГАМК_A-рецепторов. Установленная связь уровней экспрессии генов *Gabra2* и *Gabrb1* (на крысах, перенесших острое отравление без предшествующей алкоголизации) и *Gabra4* (на предварительно алкоголизованных крысах) с тяжестью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после его введения, в конечном итоге, может являться маркером токсического действия исследуемого токсиканта.

Наряду с исследованием уровня экспрессии, активно проводится изучение полиморфных участков генов в ответных реакциях организма при употреблении этанола. Научно доказанным является их влияние на экспрессию генов, что в конечном итоге может обуславливать разную степень интоксикации при отравлении этанолом. Все это определяет необходимость изучения влияния полиморфизма генов на уровень их экспрессии, а также определения связи между полиморфными сайтами и глубиной депримации для понимания патогенеза алкоголизма, а также определения прогностических маркеров тяжести течения воздействия этанола на нервную систему.

В связи с этим на следующем этапе исследований представлялось целесообразным выявить аллельные варианты генов-кандидатов, оценить уровень экспрессии целевого гена у животных с различными генотипами и выявить их возможную взаимосвязь, а также установить ассоциации полиморфизмов с глубиной депримирующего воздействия этанола на нервную систему.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА, НА ТЯЖЕСТЬ УГНЕТЕНИЯ ЦНС

Вариабельность развития эффектов организма в ответ на действие этанола может быть обусловлена не только уровнем экспрессии генов, но и генетическим полиморфизмом генома, определяющим степень интоксикации и исход отравления. В ряде экспериментальных исследований отмечается влияние полиморфизма генов ГАМК_A-рецептора на развитие алкогольной зависимости, формирование толерантности к воздействию этанола [186, 187, 188]. Различия в генотипах полиморфизмов генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора могут обуславливать анксиолитические, депрессантные и депримирующие эффекты этанола, а также определять тяжесть угнетения ЦНС при остром отравлении этанолом.

4.1. Выявление аллельных вариантов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* у белых беспородных крыс для установления их ассоциации с глубиной депримирующего воздействия этанола на нервную систему

Кроме влияния состава ГАМК_A-рецептора на нейротоксические эффекты этанола, определена значительная роль полиморфизмов генов, соответствующих субъединиц рецептора, в формировании индивидуальных ответов организмов при действии этанола [22]. К настоящему времени уже проведены исследования, в которых удалось обнаружить статистически значимые данные взаимосвязи полиморфизмов генов метаболизма алкоголя и рецепторов, транспортеров нейрорегуляторных систем с формированием алкогольной зависимости и развитием хронических заболеваний печени, как у крыс, так и у человека. В тоже время точные зависимости, определяющие степень развития алкогольной комы и тяжесть депримирующего действия этанола на нервную систему от полиморфизма генов, пока остаются малоизученными и непонятыми.

Для изучения перечисленных выше факторов в качестве биообъекта использовали лабораторных животных - белых беспородных крыс-самцов (*Rattus norvegicus*). Целесообразность применения крыс в эксперименте объяснялась несколькими фактами. Во-первых, благодаря наличию полностью расшифрованной структуры генома крыс, а также схожих биохимических особенностей организмов крыс и человека становится возможным перенесение полученных результатов с модельных объектов на людей [106]. Во-вторых, разработанный в работе В.А. Башарина алгоритм оценки депримирующего действия этанола с использованием неврологических и вегетативных показателей, позволил оценить состояние экспериментальных крыс при острых \отравлениях [1].

Для определения перечня полиморфизмов проводили информационно-теоретический поиск. В настоящей работе среди множества полиморфных маркеров, описанных в литературном обзоре, для исследования были выбраны однонуклеотидные точечные замены. Данный выбор был обусловлен следующими положениями:

1. SNP являются наиболее распространенным типом полиморфных маркеров, число которых достигает около 3 миллионов в геноме человека.

2. SNP часто приводят к изменению структуры или функции белкового продукта гена, что позволяет исследователям легко детектировать и интерпретировать полученные результаты.

3. SNP, определяемые в работе относятся к числу тех маркеров, которые с использованием современных недорогостоящих молекулярных методов можно детектировать в быстрый срок, что позволит в дальнейшем использовать их в качестве эффективных диагностических систем состояний отравленных.

На следующем этапе проводили выявление перечня однонуклеотидных точечных замен (генов, кодирующих α_{1-6} - и β_1 -субъединицы), которые будут использованы нами для проведения типирования. После анализа информации, приведенной (в 2014 г.) в базах данных Национального Центра Биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology

Information, NCBI), был составлен перечень известных полиморфизмов (более 1500 на момент 2014 года) для генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* (таблица 18).

Таблица 18 – Полиморфизмы генов: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1*

Наименование гена	Количество SNP, приведенных в базах NCBI	Локализация в гене
<i>Gabra1</i>	119	интроны, экзоны, 3'UTR
<i>Gabra2</i>	402	интроны, экзоны, 3'UTR, 5'- область около гена
<i>Gabra3</i>	35	интроны
<i>Gabra4</i>	372	интроны, 3' и 5'- области около гена
<i>Gabra5</i>	нет	нет
<i>Gabra6</i>	25	интроны, 5'- область около гена
<i>Gabrb1</i>	748	интроны, экзоны, 3'UTR

Исходя из данных, представленных в таблице 18, наличие полиморфизма ДНК было выявлено для генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1*. Для гена *Gabra5*, обнаруженное отсутствие полиморфизмов в популяции крыс, вероятно, являлось следствием консервативности его нуклеотидной последовательности. Выявленные полиморфизмы находились в различных структурных частях соответствующих нуклеотидных последовательностей. Известно, что влияние на ассоциацию с фенотипическими признаками могут оказывать точечные замены, расположенные в 3' – нетранслируемой области (3' – UTR), а также локализованные, как в кодирующей части (экзонные замены), так и в не кодирующих участках гена (интронные замены) (рисунок 15). [205].



Рисунок 15 – Строение типичной ДНК

В данной работе мы использовали однонуклеотидные полиморфизмы, локализованные в разных областях гена - регуляторного региона 3' – UTR,

экзонной и интронной областях, для оценки функциональной значимости каждого региона в патогенетических механизмах отравления этанолом (таблица 19).

Таблица 19 – Характеристика полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1*

№	Полиморфизм (аллели)	Наименование гена	Область гена	Тип полиморфизма
1	rs107127945 (G/T)	<i>Gabra1</i>	3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
2	rs197587817 (C/T)		Экзон	Синонимичный (115 Leu/Leu)
3	rs105733011 (C/T)	<i>Gabra2</i>	Экзон	Синонимичный (406 Ala/Ala)
4	rs8168342 (A/G)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
5	rs198286814 (A/G)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
6	rs198837638 (A/G)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
7	rs107413315 (A/T)	<i>Gabra3</i>	Интрон	Интронный
8	rs105096249 (A/T)		Интрон	Интронный
9	rs197596713 (G/T)	<i>Gabra4</i>	Интрон	Интронный
10	rs105966045 (A/G)		Интрон	Интронный
11	rs106047548 (C/T)	<i>Gabra6</i>	Интрон	Интронный
12	rs107063497 (C/T)		Экзон	Несинонимичный, миссенс (52 Arg/Gln)
13	rs13456854 (C/T)	<i>Gabrb1</i>	3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
14	rs13456853 (C/T)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
15	rs13456852 (C/T)		Экзон	Несинонимичный, миссенс (447 Asn/Lys)
16	rs13456851 (C/T)		Экзон	Несинонимичный, миссенс (432 Arg/Arg)

На заключительном этапе отбора полиморфных маркеров осуществляли генетический анализ (с использованием метода ПЦР-РВ) образцов ДНК, выделенных из периферической венозной крови крыс. Результаты проведенного генотипирования позволили выявить не приведенное в базе данных dbSNP (NCBI) распределение аллельных вариантов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1* у исследуемой популяции крыс (таблица 20).

Таблица 20 - Распределение частот генотипов полиморфных вариантов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1*

№ п/п	Генетический вариант	Количество животных с различными генотипами, N (%)		
		Гомозигота по «дикому» аллелю	Гетерозигота	Гомозигота по «редкому» аллелю
<i>Gabra1</i>				
1	G/T (rs107127945)	60 (75,00)	19 (23,75)	1 (1,25)
2	C/T (rs197587817)	57 (71,25)	22 (27,5)	1 (1,25)
<i>Gabra2</i>				
3	C/T (rs105733011)	65 (81,25)	15 (18,75)	0 (0)
4	A/G (rs8168342)	67 (83,75)	13 (16,25)	0 (0)
5	A/G (rs198286814)	66 (82,50)	14 (17,50)	0 (0)
6	A/G (rs198837638)	68 (85,00)	12 (15,00)	0 (0)
<i>Gabra3</i>				
7	A/T (rs107413315)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
8	A/T (rs105096249)	68 (85,00)	12 (15,00)	0 (0)
<i>Gabra4</i>				
9	G/T (rs197596713)	56 (70,00)	22 (27,50)	2 (2,50)
10	A/G (rs1055966045)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
<i>Gabra6</i>				
11	C/T (rs106047548)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
12	C/T (rs107063497)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
<i>Gabrb1</i>				
13	C/T (rs13456854)	70 (87,50)	9 (11,25)	1 (1,25)
14	C/T (rs13456853)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
15	C/T (rs13456852)	71 (88,75)	8 (10,00)	1 (1,25)
16	C/T (rs13456851)	69 (86,25)	11 (13,75)	0 (0)

Как следует из результатов, приведенных в таблице 20, генетическое разнообразие выявлено для 11 (из 16 исследуемых) полиморфизмов: rs107127945, rs197587817, rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638, rs13456854, rs13456852, rs13456851, rs105096249, rs197596713. Наличие трех возможных генотипов (гомозиготных вариантов по «дикиим» и «редким» аллелям, а также гетерозиготных вариантов) обнаружено для полиморфизмов rs107127945, rs197587817, rs197596713, rs13456854, rs13456852. Причем для данных полиморфизмов обнаружена малая частота «редкого» аллеля, что может свидетельствовать о низкой встречаемости их в исследуемой популяции. Также из полученных результатов видно, что среди крыс отсутствует генетическое разнообразие генотипов А/Т (rs107413315) по гену *Gabra3*, А/Г (rs1055966045) по гену *Gabra4*, С/Т (rs13456853) по гену *Gabrb1*, а также С/Т (rs106047548) и С/Т (rs107063497) по гену *Gabra6*. В связи с этим, можно сделать предположение о том, что данные полиморфизмы не будут оказывать значимого влияния на выраженность отравления этанолом у крыс.

Впервые полученные в данной работе данные распределения частот генотипов исследуемых полиморфных вариантов позволили выделить 11 вариантов соответствующих генов, которые могут влиять на степень интоксикации этанолом у крыс. Таким образом на следующем этапе рассматривается оценка влияния выбранных SNP (rs107127945, rs197587817, rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638, rs13456854, rs13456852, rs13456851, rs105096249, rs197596713) на уровень экспрессии исследуемых генов и степень депримирующего действия этанола при острой и хронической интоксикации животных.

4.2. Изучение зависимости уровня экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* от генотипа крыс

Некоторые однонуклеотидные точечные замены посредством влияния на процесс транскрипции могут приводить к изменению уровня экспрессии генов, что в конечном итоге может быть основой неврологических нарушений при

отравлении этанолом. В связи с этим было изучено: является ли функциональная активность (определяемая в виде уровня экспрессии) исследуемых генов признаком, зависимым от полиморфизма.

Для решения этой задачи было проведено исследование по оценке влияния генотипа исследуемых групп животных (интактных и предварительно алкоголизованных животных, а также крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации и без нее) на УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1*, для которых в разделе 4.1 было выявлено генетическое разнообразие и определены генотипы выбранных для изучения однонуклеотидных точечных замен. Ген *Gabra5* в этой части работы исключен поскольку в его нуклеотидной последовательности SNP не были представлены. Значения УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в образцах головного мозга интактных крыс и крыс, перенесших острое отравление (спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀) в зависимости от генетических вариантов полиморфизмов представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Относительный уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в образцах мозга интактных крыс и крыс, перенесших острое отравление (спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀) в зависимости от генотипа, Me (25; 75 percentile)

Ген (полиморфизм)	Генотип	Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от генотипа, % (количество животных)	
		интактные крысы	крысы, после острого отравления этанолом спустя 8 часов
<i>Gabra1</i> rs107127945 (G/T)	G/G	70,7 [53,9-90,6] (n=15)	239,5 [136,48-360,58] (n=74)
	G/T	60,6 [57,0-69,1] (n=5)	246,4 [139,12-748,27] (n=17)
	T/T	-	547,9 (n=1)

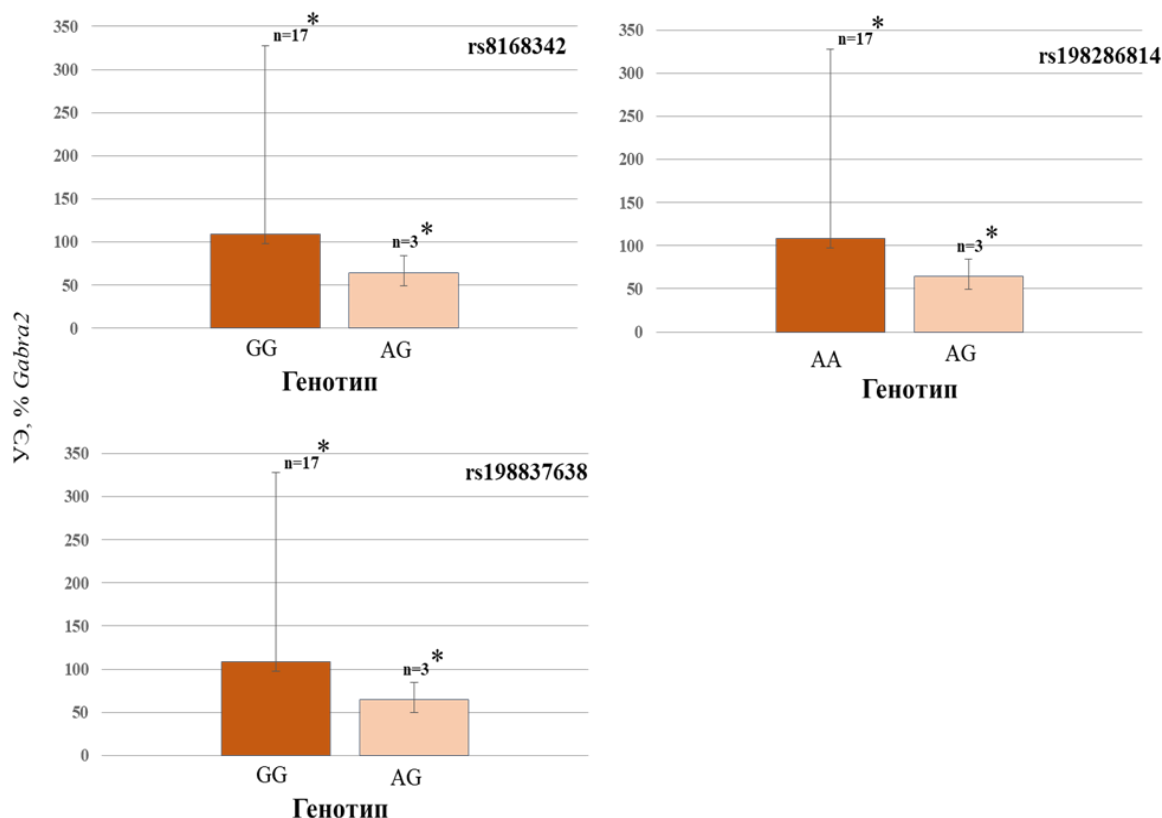
Ген (полиморфизм)	Генотип	Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от генотипа, % (количество животных)	
		интактные крысы	крысы, после острого отравления этанолом спустя 8 часов
<i>Gabra1</i> rs197587817 (C/T)	T/T	70,7 [53,9-90,6] (n=15)	239,5 [131,3-400,5] (n=68)
	C/T	60,7 [57,0-69,1] (n=5)	269,1 [148,3-499,9] (n=21)
	C/C	-	547,9 (n=1)
<i>Gabra2</i> rs105733011 (C/T)	C/C	108,1 [96,1-303,3] (n=16)	75,2 [46,5-274,6] (n=70)
	C/T	74,8 [56,8-227,8] (n=4)	90,7 [30,9-107,9] (n=13)
<i>Gabra2</i> rs8168342 (A/G)	G/G	108,6* [96,9-327,9] (n=17)	82,9 [45,5-330,7] (n=64)
	A/G	64,6* [49,1-84,9] (n=3)	90,7 [50,3-107,9] (n=9)
<i>Gabra2</i> rs198286814 (A/G)	A/A	108,6* [96,9-327,9] (n=17)	73,4 [44,31-279,71] (n=73)
	A/G	64,6* [49,1-84,9] (n=3)	85,5 [43,3-104,6] (n=12)
<i>Gabra2</i> rs198837638 (A/G)	G/G	108,6* [96,8-327,9] (n=17)	74,9 [44,9-289,9] (n=75)
	A/G	64,6* [49,1-84,9] (n=3)	83,3 [33,6-107,1] (n=10)
<i>Gabra3</i> rs105096249 (A/T)	T/T	79,0 [55,3-91,1] (n=20)	48,4 [26,9-112,3] (n=69)
	A/T	-	109,4 [31,5-715,6] (n=11)

Ген (полиморфизм)	Генотип	Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от генотипа, % (количество животных)	
		интактные крысы	крысы, после острого отравления этанолом спустя 8 часов
<i>Gabra4</i> rs197596713 (G/T)	T/T	63,3 [40,9-78,2] (n=15)	382,5 [247,9-857,4] (n=55)
	G/T	63,8 [38,1-86,5] (n=4)	236,8 [202,5-427,5] (n=20)
	G/G	37,4 (n=1)	111,7 [101,5-2357,9] (n=3)
<i>Gabrb1</i> rs13456854 (C/T)	T/T	86,7* [68,3-89,3] (n=17)	124,9 [73,7-325,9] (n=79)
	C/T	55,8* [45,9-59,4] (n=3)	204,6 [46,5-310,6] (n=11)
	C/C	-	69,10 (n=1)
<i>Gabrb1</i> rs13456852 (C/T)	C/C	86,7* [68,3-89,3] (n=17)	128,3 [73,9-317,1] (n=80)
	C/T	55,8* [45,9-59,4] (n=3)	195,7 [42,3-352,6] (n=10)
	T/T	-	69,1 (n=1)
<i>Gabrb1</i> rs13456851 (C/T)	T/T	86,7* [68,3-89,3] (n=17)	128,3 [74,5-377,7] (n=78)
	C/T	55,8* [45,9-59,4] (n=3)	186,7 [39,3-300,7] (n=13)

Примечание: * – статистически значимое (p<0,05) различие показателя между животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «гетерозиготным» аллелям (в рамках одного полиморфизма); n – число животных

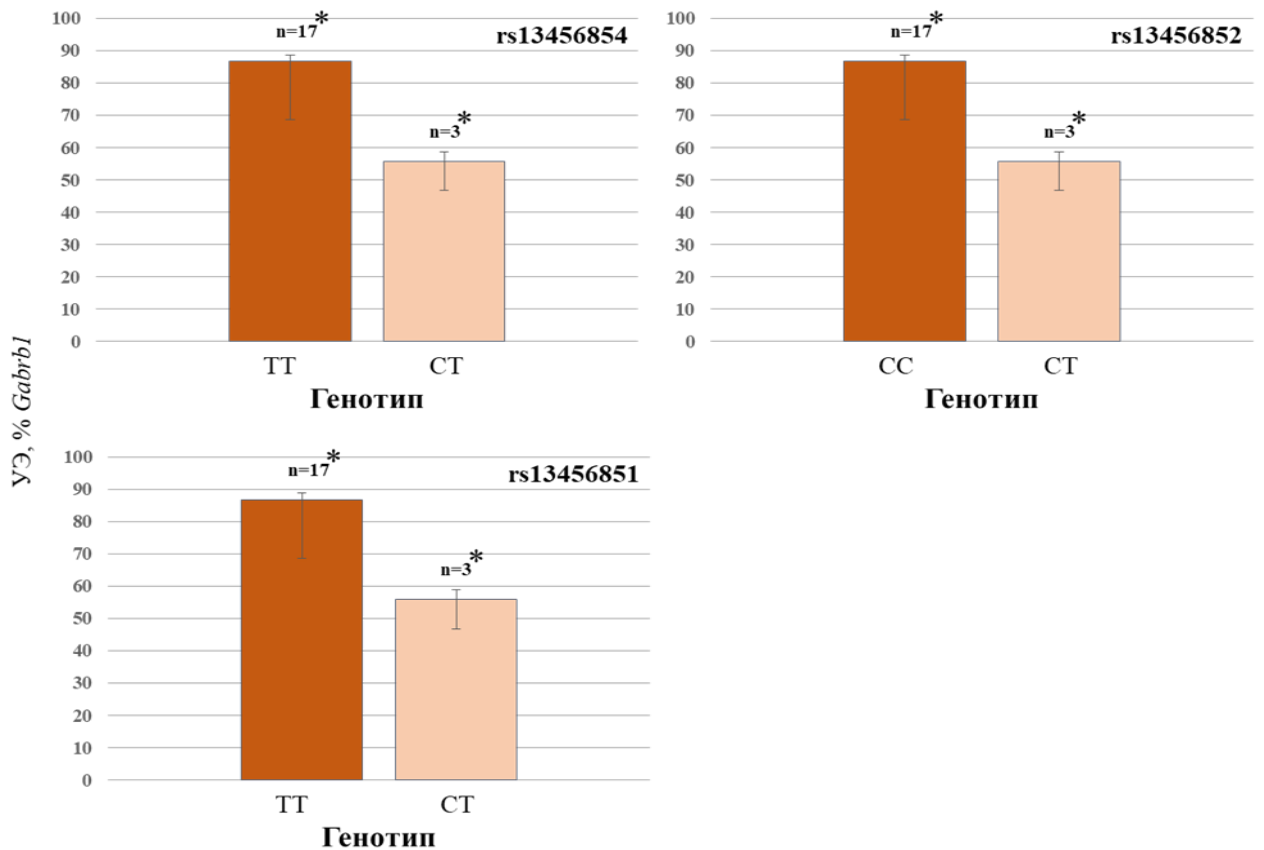
Статистически значимые различия уровня экспрессии генов *Gabra2* и *Gabrb1* в головном мозге животных с различными генотипами наблюдались только у интактных крыс. Показатель УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в головном мозге животных спустя 8 часов после острого воздействия этанолом также варьировал в зависимости от генотипа, однако выявленные различия не достигали минимального уровня значимости.

На модели интактных крыс наблюдали достоверные различия УЭ гена *Gabra2* в образцах головного мозга для носителей различных генотипов по полиморфизмам rs8168342, rs198286814, rs198837638, а также для гена *Gabrb1* по полиморфизмам rs13456854, rs13456852 и rs13456851 (рисунок 16 и 17, соответственно).



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) показателя между животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «гетерозиготным» аллелям; n – количество животных в группе

Рисунок 16 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra2* в головном мозге интактных крыс от генотипа G/A (rs8168342), A/G (rs198286814), G/A (rs198837638), Me (25; 75 percentile)



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) показателя между животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «гетерозиготным» аллелям; n – количество животных в группе

Рисунок 17 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге интактных крыс в зависимости от генотипа T/C (rs13456854), C/T (rs13456852), T/C (rs13456851), Me (25; 75 percentile)

Схожие изменения были обнаружены для гена *Gabrb1* (рисунок 17). Так, было установлено, что у крыс с генотипом T/T, C/C, T/T (по полиморфизмам rs13456854, rs13456852 и rs13456851) УЭ гена *Gabrb1* был значимо выше на 31% по сравнению с генотипом C/T (при $p = 0,030$).

Результаты изучения динамики изменения УЭ исследуемых генов в зависимости от генетических полиморфизмов у предварительно алкоголизованных крыс после острого воздействия этанолом и без него представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Относительный уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в образцах мозга предварительно алкоголизованных крыс на фоне острого отравления (спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀) и без него в зависимости от генотипа, Ме (25; 75 percentile)

Ген (полиморфизм)	Генотип	Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от генотипа, % (количество животных)	
		предварительно алкоголизованные крысы	предварительно алкоголизованные крысы, после острого отравления этанолом спустя 8 часов
<i>Gabra1</i> rs107127945 (G/T)	G/G	62,2 [54,4-77,9] (n=19)	62,9* [45,8-71,8] (n=11)
	G/T	50,4 (n=1)	105,7* [92,9-118,5] (n=2)
<i>Gabra1</i> rs197587817 (C/T)	T/T	62,2 [54,4-77,9] (n=19)	62,9* [45,7-71,8] (n=11)
	C/T	50,4 (n=1)	105,7* [92,9-118,5] (n=2)
<i>Gabra2</i> rs105733011 (C/T)	C/C	75,0 [61,0-89,7] (n=14)	75,0 [61,0-89,7] (n=14)
	C/T	89,8 [62,2-108,0] (n=6)	89,8 [62,2-108,0] (n=6)
<i>Gabra2</i> rs8168342 (A/G)	G/G	75,0 [61,0-89,7] (n=14)	85,2 [70,6-103,1] (n=9)
	A/G	89,9 [62,2-108,0] (n=6)	77,6 [75,3-107,4] (n=4)

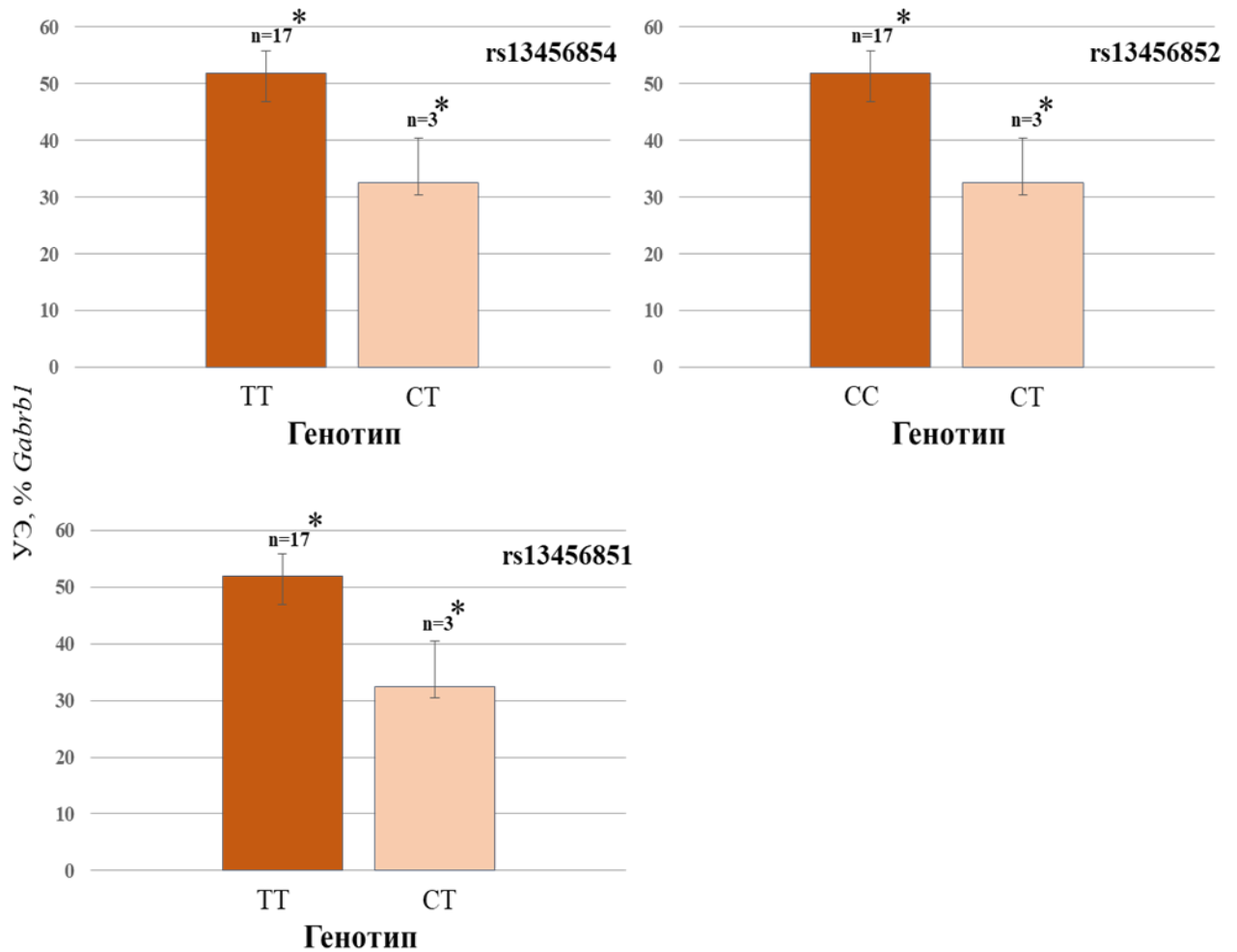
Ген (полиморфизм)	Генотип	Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от генотипа, % (количество животных)	
		предварительно алкоголизованные крысы	предварительно алкоголизованные крысы, после острого отравления этанолом спустя 8 часов
<i>Gabra2</i> rs198286814 (A/G)	A/A	75,0 [61,0-89,7] (n=14)	85,2 [70,6-103,1] (n=9)
	A/G	89,9 [62,2-108,0] (n=6)	77,6 [75,3-107,4] (n=4)
<i>Gabra2</i> rs198837638 (A/G)	G/G	75,0 [61,0-89,7] (n=14)	85,2 [70,6-103,1] (n=9)
	A/G	89,9 [62,2-108,0] (n=6)	77,6 [75,3-107,4] (n=4)
<i>Gabra3</i> rs105096249 (A/T)	T/T	88,6 [67,6-96,7] (n=20)	104,5 [85,8-121,1] (n=10)
	A/T	-	62,9 [45,2-198,4] (n=3)
<i>Gabra4</i> rs197596713 (G/T)	T/T	50,1 [37,6-76,4] (n=11)	87,0 [70,5-92,2] (n=8)
	G/T	49,7 [31,4-85,6] (n=8)	119,1 [75,8-162,5] (n=2)
	G/G	74,8 (n=1)	81,6 [58,1-84,3] (n=3)
<i>Gabrb1</i> rs13456854 (C/T)	T/T	51,9* [46,1-56,6] (n=17)	72,4 [53,7-199,5] (n=10)
	C/T	32,5* [30,1-40,8] (n=3)	120,9 [55,8-140,7] (n=3)

Ген (полиморфизм)	Генотип	Относительный уровень экспрессии генов в зависимости от генотипа, % (количество животных)	
		предварительно алкоголизованные крысы	предварительно алкоголизованные крысы, после острого отравления этанолом спустя 8 часов
<i>Gabrb1</i> rs13456852 (C/T)	C/C	51,9* [46,1-56,6] (n=17)	72,4 [53,7-199,5] (n=10)
	C/T	32,5* [30,1-40,8] (n=3)	120,9 [55,8-140,7] (n=3)
<i>Gabrb1</i> rs13456851 (C/T)	T/T	51,9* [46,1-56,6] (n=17)	72,4 [53,7-199,5] (n=10)
	C/T	32,5* [30,1-40,8] (n=3)	120,9 [55,8-140,7] (n=3)

Примечание – * – статистически значимое ($p < 0,05$) различие показателя между животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «гетерозиготным» аллелям (в рамках одного полиморфизма). n – число животных

На основании полученных данных были выявлены значимые различия УЭ в головном мозге предварительно алкоголизованных крыс в зависимости от варианта гена *Gabrb1*, а также у предварительно алкоголизованных животных после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀ в зависимости от варианта гена *Gabra1*. Статистически значимых различий уровней экспрессии в головном мозге между носителями разных генотипов генов *Gabra2*, *Gabra3* и *Gabra4* среди представителей данной популяции крыс не выявлено.

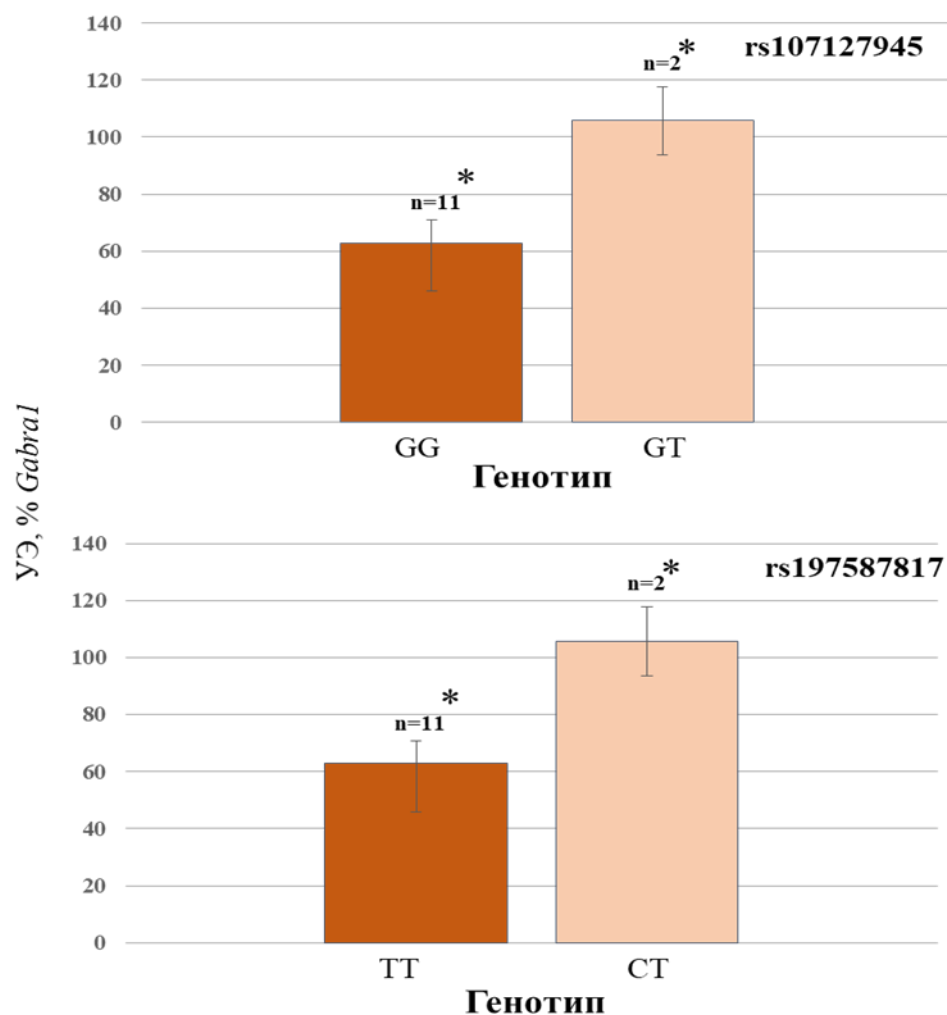
Установлено, что у носителей генотипов T/T, C/C, T/T локусов rs13456854, rs13456852, rs13456851 уровень экспрессии гена *Gabrb1* был значимо выше на 20% (при $p = 0,017$) по сравнению с носителями генотипа C/T (рисунок 18).



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) показателя между животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «гетерозиготным» аллелям;
 n – количество животных в группе

Рисунок 18 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге предварительно алкоголизованных крыс в зависимости от генотипа T/C (rs13456854), C/T (rs13456852), T/C (rs13456851), Me (25; 75 percentile)

В группе предварительно алкоголизованных крыс после острого отравления этанолом оказалось, что уровень экспрессии гена *Gabra1* был, наоборот, ниже на 43% у животных носителей гомозиготных генотипов G/G и T/T (rs107127945 и rs197587817, соответственно), чем у носителей гетерозиготных генотипов (рисунок 19).



* – статистически значимые различия ($p < 0,05$) показателя между животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «гетерозиготным» аллелям; n – количество животных в группе

Рисунок 19 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra1* в головном мозге предварительно алкоголизованных крыс после острого отравления этанолом в зависимости от генотипа G/T (rs107127945), C/T (rs197587817), Me (25; 75 percentile)

Полученные результаты на модели интактных и предварительно алкоголизованных животных, а также крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации, свидетельствуют о том, что генетические полиморфизмы в генах *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabrb1* могут определять уровень их экспрессии и тем самым оказывать влияние на проявление интоксикации этанолом. Однако, хорошо известно, что доказательство связи полиморфизма с экспрессией гена является трудной, сложной задачей

экспериментальной, а также молекулярной генетики и требуют дополнительных исследований. В связи с этим полученные результаты представляют особый интерес для дальнейших изучений в условиях модельных систем. Последующие исследования, вероятно, смогут более полно прояснить связь между генотипами генов ГАМК_A-рецептора и уровнем экспрессии гена.

4.3. Влияние полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* на степень депримирующего действия этанола при острой интоксикации животных

Основной задачей данной части работы являлось определение возможного влияния однонуклеотидных точечных замен (генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1*) на формирование степени тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему крыс с острым отравлением этанолом и острым отравлением этанолом на фоне предварительной алкоголизации. Для этого у животных отбирали образцы крови, выделяли ДНК и проводили генотипирование с использованием метода ПЦР-РВ. Затем крысам вводили этанол в дозе 0,8 ЛД₅₀. После острого отравления крыс спустя 3 ч (по достижению глубокого угнетения ЦНС) и 8 ч (по достижению физиологической нормы ЦНС) проводили оценку состояния экспериментальных животных с использованием алгоритма, описанного в разделе 2.6.

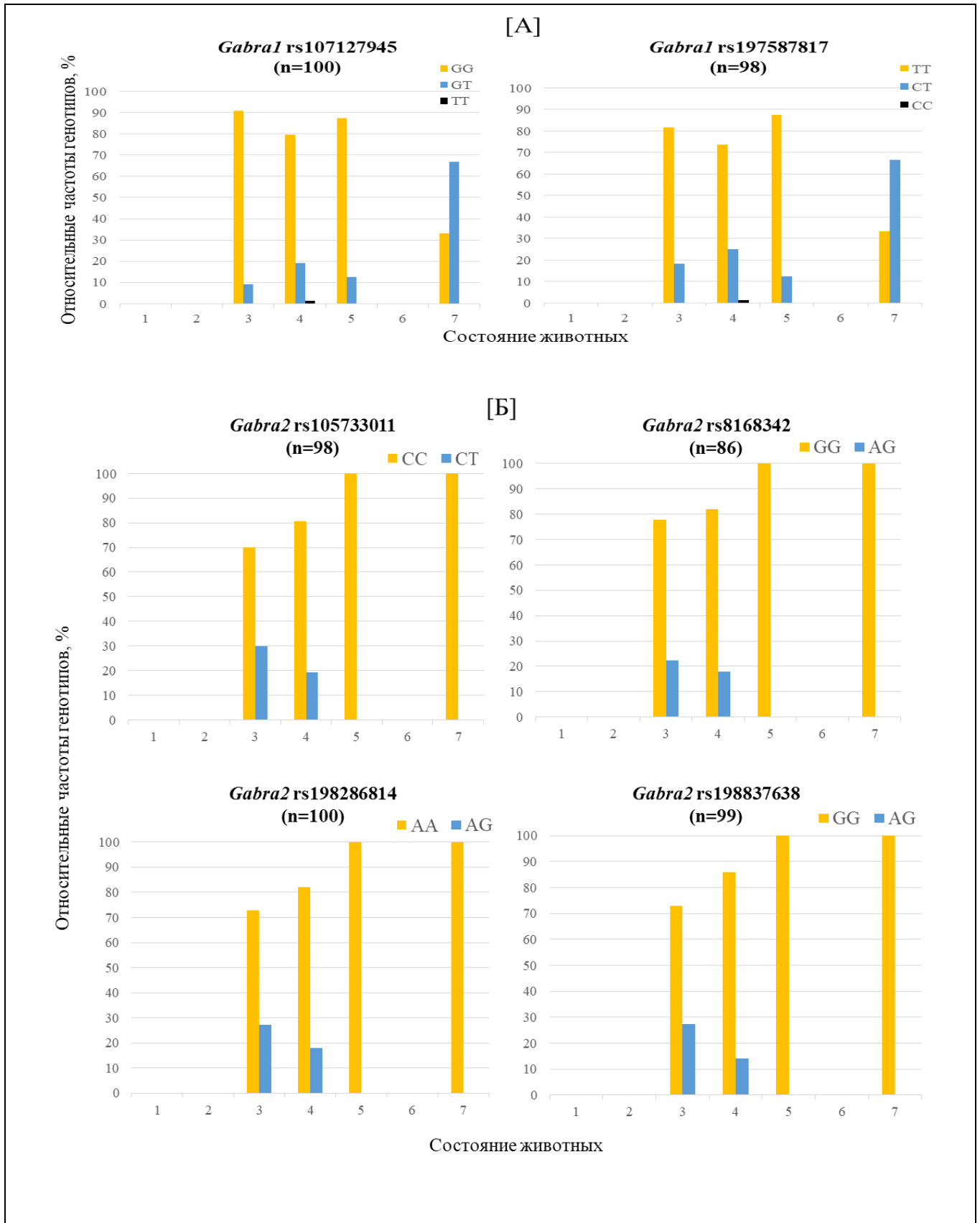
После проведения экспериментальной части проводили обработку полученных результатов. Определение ассоциации между степенью угнетения функционирования ЦНС и полиморфизмом проводили на основании сравнения распределения генотипов по каждому SNP между группами животных с использованием критерия χ^2 – критерия Пирсона (при условии, когда объем выборки не превышал 5 случаев, использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса, либо двусторонний точный критерий Фишера). Относительный риск развития степени угнетения ЦНС по конкретному генотипу вычисляли как «отношение шансов» (OR-odds ratio). Значения отношения шансов с 95 % доверительным интервалом рассчитывали используя он-лайн программу «Калькулятор для

расчета отношения шансов» [14]. Значение $OR = 1$ рассматривали как отсутствие ассоциации, $OR > 1$ – как положительную ассоциацию (повышенный риск развития степени угнетения ЦНС), $OR < 1$ – как отрицательную ассоциацию (пониженный риск развития степени угнетения ЦНС). Формулирование выводов проводили на основании значимых различий в распределении частот встречаемости генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* у исследуемых групп животных.

4.3.1. Анализ полиморфизма генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* на модели острой интоксикации этанолом крыс

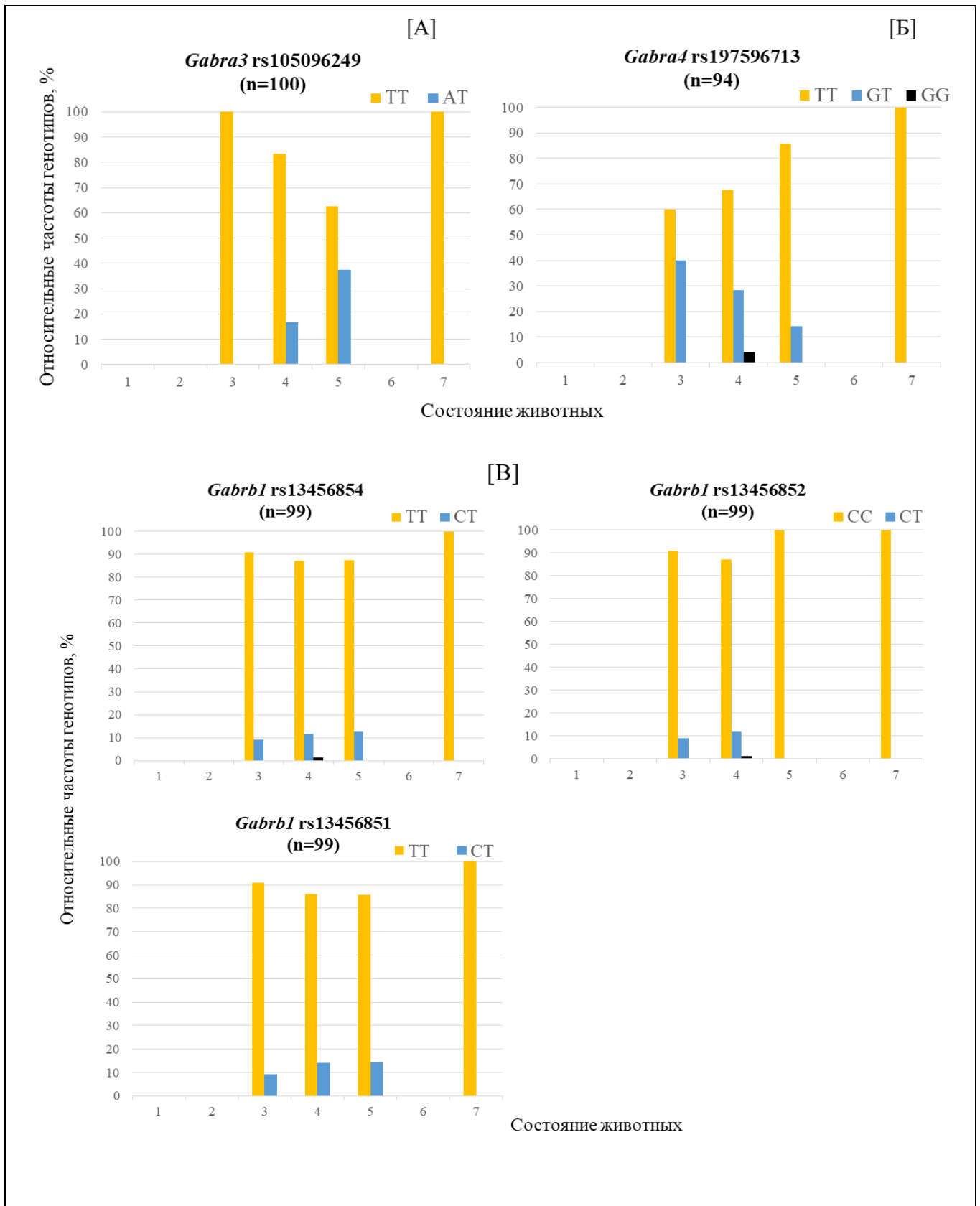
Проводились исследования по установлению ассоциации исследуемых полиморфизмов со степенью угнетения ЦНС спустя 3 и 8 часов после острой интоксикации этанолом крыс. Относительные частоты генотипов *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabrb1* в зависимости от состояния животных спустя 3 часа представлены на рисунках 20 и 21, соответственно. На приведенных здесь и ниже диаграммах отображено распределение животных по состояниям, соответствующим статусам:

- 1 – «физиологическая норма»;
- 2 – «оглушение»;
- 3 – «сопор»;
- 4 – «умеренная кома»;
- 5 – «глубокая кома»
- 6 – «терминальная кома»
- 7 – «летальный исход»



n – количество животных в группе

Рисунок 20 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra1* (A), *Gabra2* (Б) в зависимости от состояния крыс

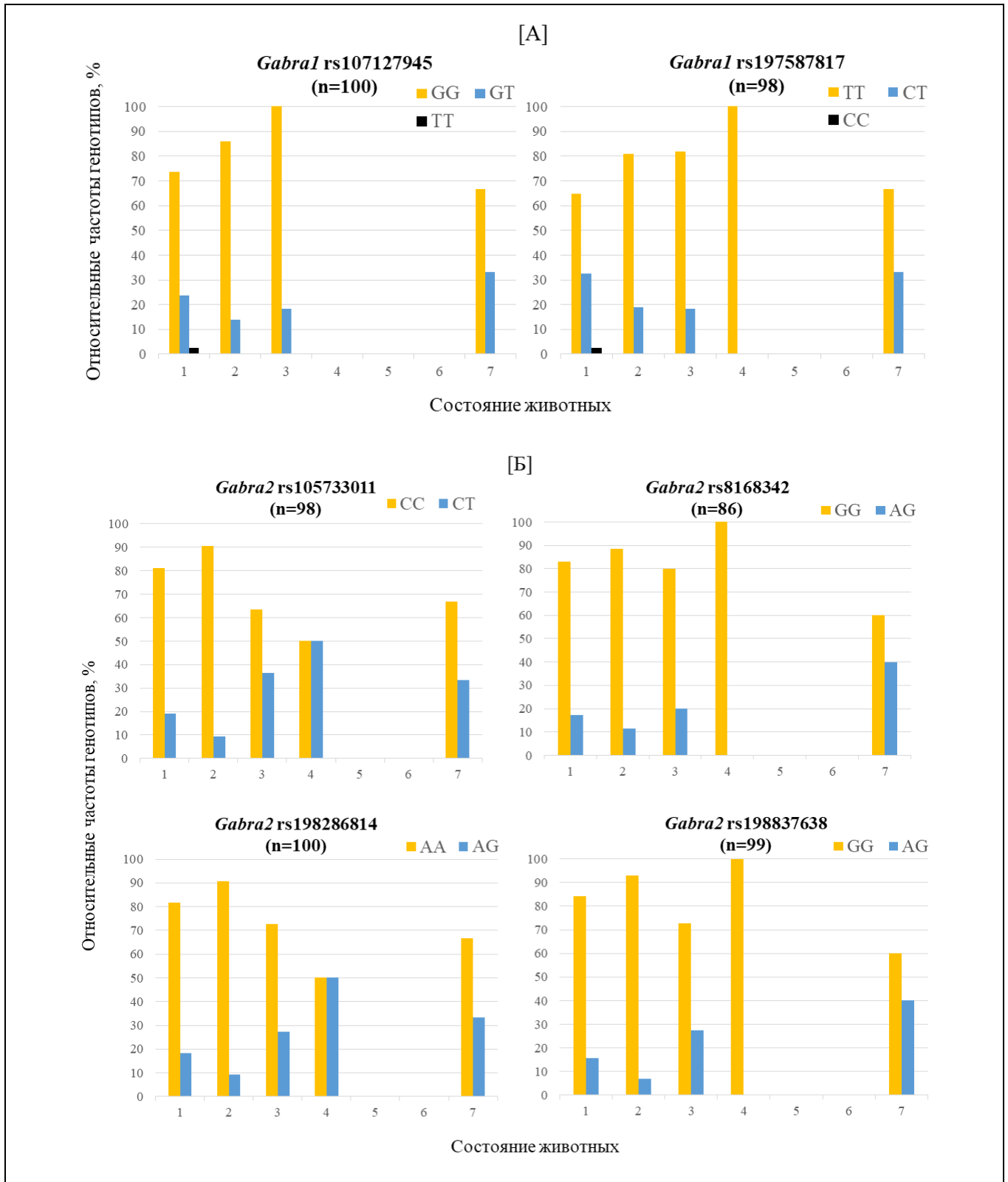


n – количество животных в группе

Рисунок 21 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra3* (А), *Gabra4* (Б) и *Gabrb1* (В) в зависимости от состояния крыс

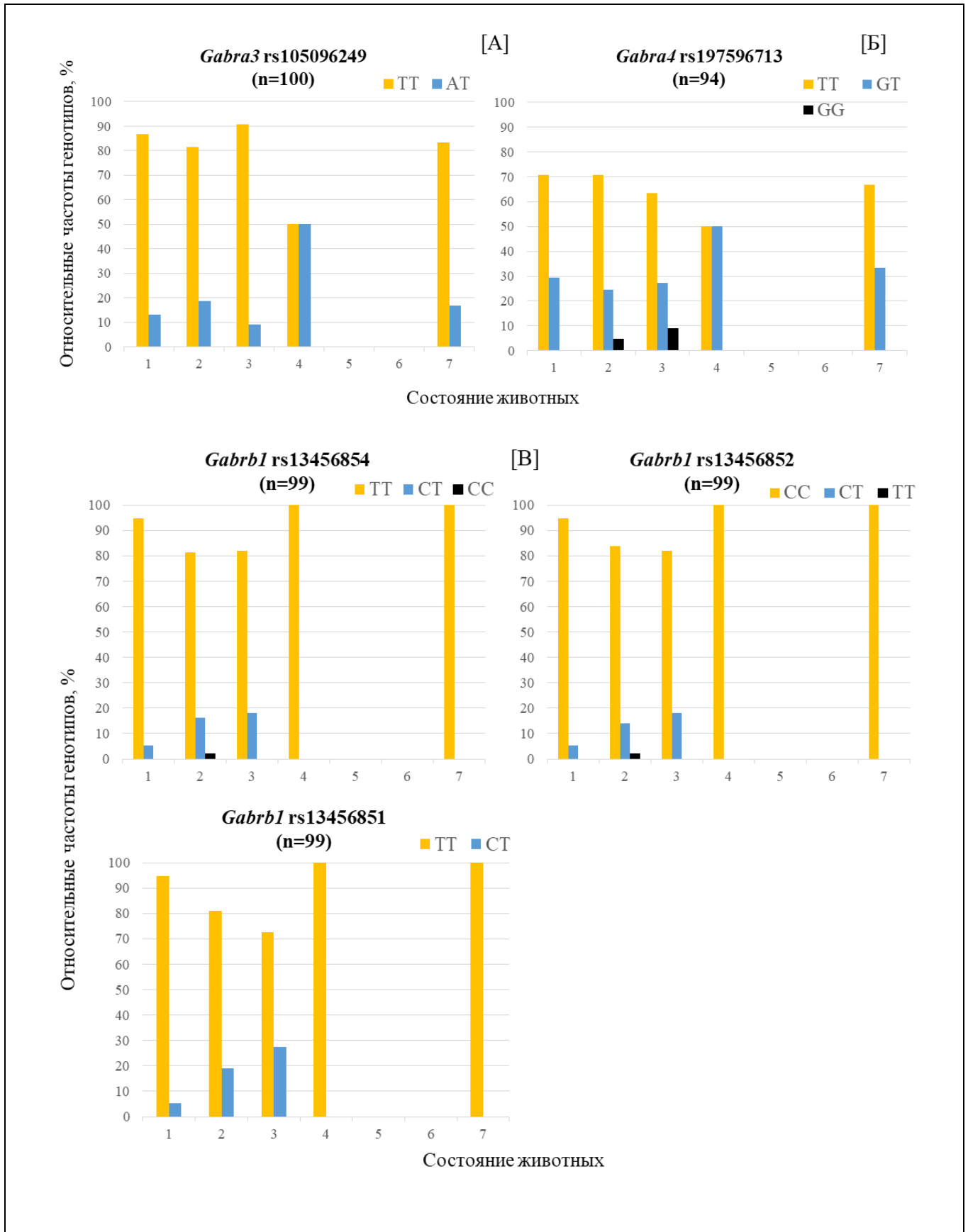
Из данных, представленных на рисунках 20 и 21, видно, что спустя 3 часа после острой интоксикации этанолом у животных были зарегистрированы состояния: «сопор», «умеренная кома», «глубокая кома» и «летальный исход». Состояния «физиологическая норма», «оглушение» и «терминальная кома» у экспериментальных животных не были зарегистрированы. Анализ полученных результатов не выявил статистически значимых различий ($p > 0,05$) в распределении частот генотипов в данных группах (приложение А, таблица 1). На наш взгляд, отсутствие значимых различий может быть связано с тем, что основная часть животных имела умеренные характеристики неврологических нарушений (состояние «умеренная кома» - 78% крыс) спустя 3 часа после острого отравления (рисунок 5, раздел 3.2).

Результаты распределения частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* у крыс спустя 8 часов после острого отравления этанолом представлены на рисунках 22 и 23.



n – количество животных в группе

Рисунок 22 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra1* (A), *Gabra2* (Б) в зависимости от состояния крыс

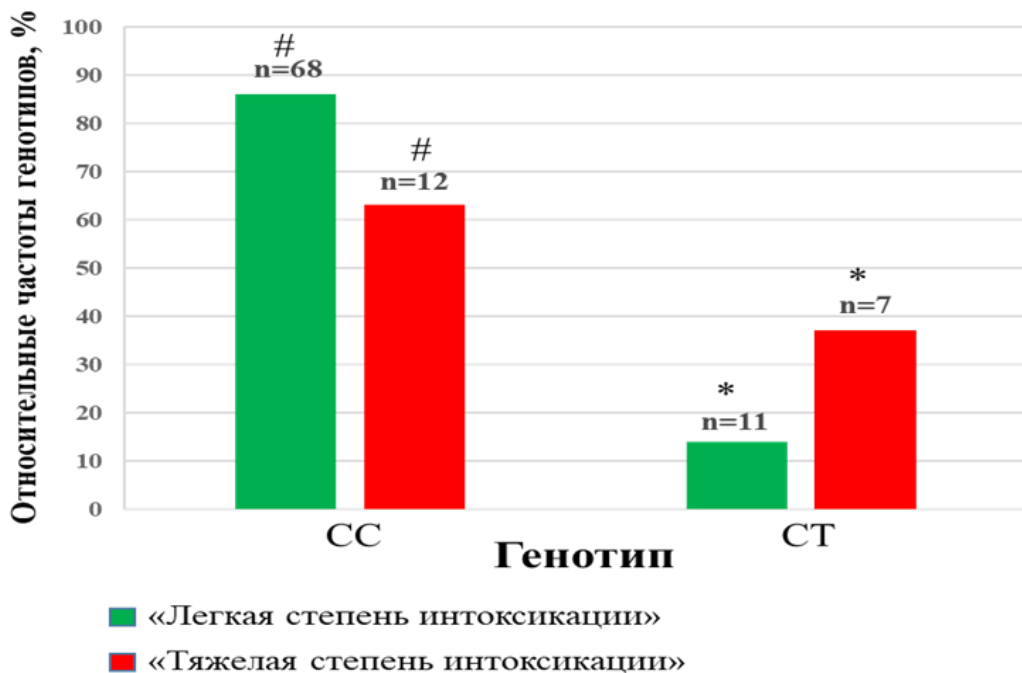


n – количество животных в группе

Рисунок 23 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra3* (А), *Gabra4* (Б) и *Gabrb1* (В) в зависимости от состояния крыс

Данные, представленные на рисунках 22 и 23 демонстрируют, что спустя 8 ч после острого отравления этанолом у некоторых животных произошло восстановление статуса неврологических показателей до состояния «физиологическая норма» или «оглушение». Состояние остальных выживших животных оценивалось как «сопор» или «умеренная кома». На основании проведенного анализа статистически значимых различий распределения частот генотипов в исследуемых группах не обнаружено (приложение А, таблица 2). По нашему мнению, отсутствие достоверных отличий может быть связано с тем, что определение статистических различий частот генотипов проводился у групп животных, состояние которых характеризовалось близкими визуально оцениваемыми клиническими проявлениями, разделенными на семь типов индекса тяжести неврологических нарушений. Тем не менее, наблюдаемое различие в частотах генотипов может свидетельствовать о наличии их связи с тяжестью депримирующего воздействия этанола, а использование подхода, основанного на анализе различий генотипов по объединенным группам (на основании состояния крыс) может позволить выявить ассоциацию между аллелем и степенью интоксикации. В связи с этим нами был разработан методический аппарат, позволяющий оценить вклад полиморфизмов в развитие той или иной степени интоксикации. Для этого оценку ассоциации исследуемых полиморфизмов со степенью угнетения ЦНС после введения этанола проводили у животных двух групп, объединенных по общему признаку – степени интоксикации. Крысы, состояние которых через 8 часов после острого воздействия этанолом оценивалось как «физиологическая норма» и «оглушение», вошли в группу «легкая степень интоксикации». Животные, находящиеся в состоянии «сопор», «поверхностная кома», «глубокая кома», «терминальная кома», «летальный исход», были объединены в группу «тяжелая степень интоксикации». В ходе дальнейшего анализа данных, полученных путем сравнения частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* между объединенными группами животных (на основании состояния), выяснилось, что частоты генотипов С/С и С/Т полиморфного маркера rs105733011 по гену *Gabra2*

в группах крыс с «легкой степенью интоксикации» и «тяжелой степенью интоксикации» достоверно отличаются между собой ($p=0,042$, $\chi^2 = 5,37$). Данные представленные на рисунке 24 демонстрируют, что частота встречаемости генотипа С/Т была значимо выше среди животных группы «тяжелая степень интоксикации» - 37,0 %, чем в группе «легкая степень интоксикации» - 14% (рисунок 24). В то же время достоверное преобладание генотипа С/С в группе животных «легкое течение алкогольной интоксикации» свидетельствует об ассоциации гомозиготного варианта С/С с пониженным риском развития «тяжелой степени интоксикации». Кроме того, рассчитанное значение отношения шансов ($OR = 3,62$ с доверительным интервалом: ДИ = [1,17–11,15]) дает нам основание утверждать, что, скорее всего, носительство аллеля *T* в гетерозиготном состоянии в 3,6 раза увеличивает риск развития тяжелых неврологических состояний («сопор», «поверхностная кома», «глубокая кома», «терминальная кома», «летальный исход») спустя 8 ч после острой интоксикации этанолом.

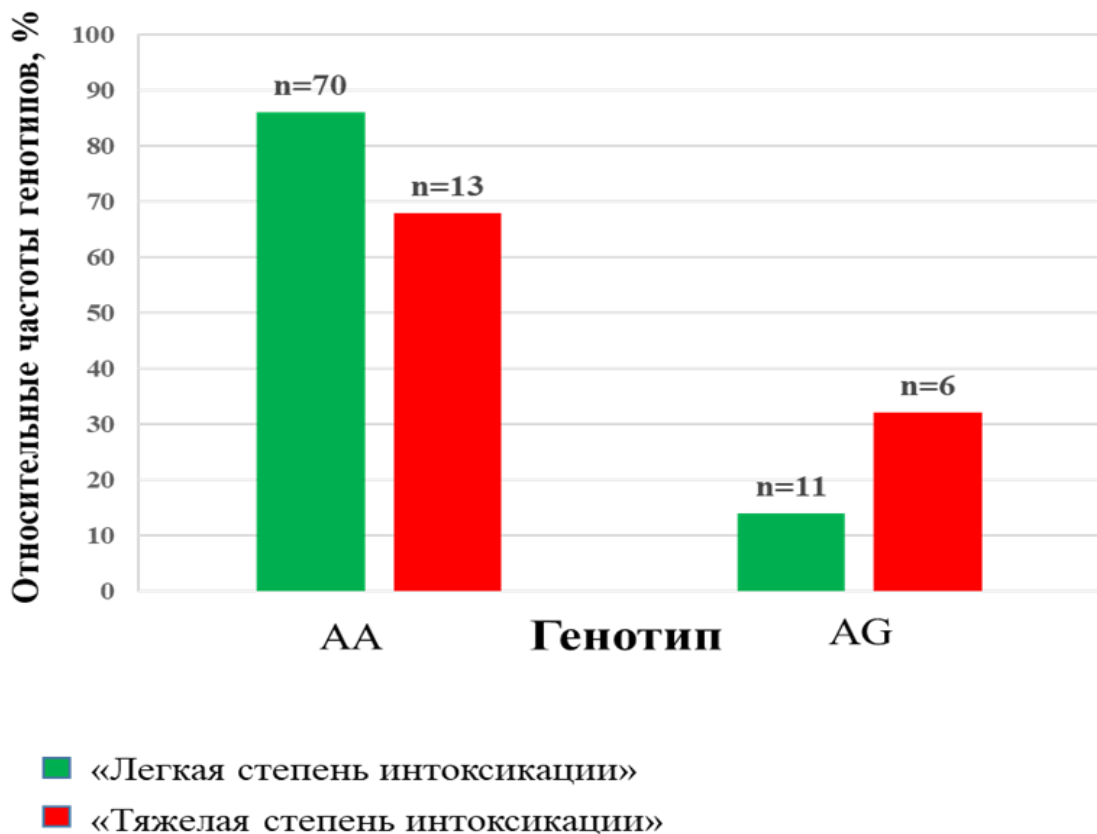


* , # – значимые ($p<0,05$) различия между группами животных с различными генотипами; n – количество животных в группе

Рисунок 24 – Распределение генотипов полиморфизма rs105733011 гена *Gabra2* у крыс в группах «легкая степень интоксикации» и «тяжелая степень интоксикации»

Для полиморфизмов rs107127945, rs197587817, rs8168342, rs198286814, rs198837638, rs13456854, rs13456852, rs13456851, rs105096249, rs197596713 значимых отличий в распределении частот генотипов у животных с «легкой степенью интоксикации» и «тяжелой степенью интоксикации» не выявлено.

Тем не менее для полиморфизма rs198286814, локализованного в регуляторной 3' – UTR области гена *Gabra2*, была установлена тенденция ($p=0,086$, $\chi^2 = 3,53$) к наиболее частой встречаемости генотипа A/G в группе животных с «тяжелой степенью интоксикации», что может свидетельствовать о существовании связи между данным полиморфизмом гена, кодирующего α_2 -субъединицу ионотропного ГАМК_A-рецептора и реакцией ЦНС на острую интоксикацию этанолом (рисунок 25).



n – количество животных в группе

Рисунок 25 – Распределение генотипов полиморфизма rs198286814 гена *Gabra2* у крыс в группах «легкая степень интоксикации» и «тяжелая степень интоксикации»

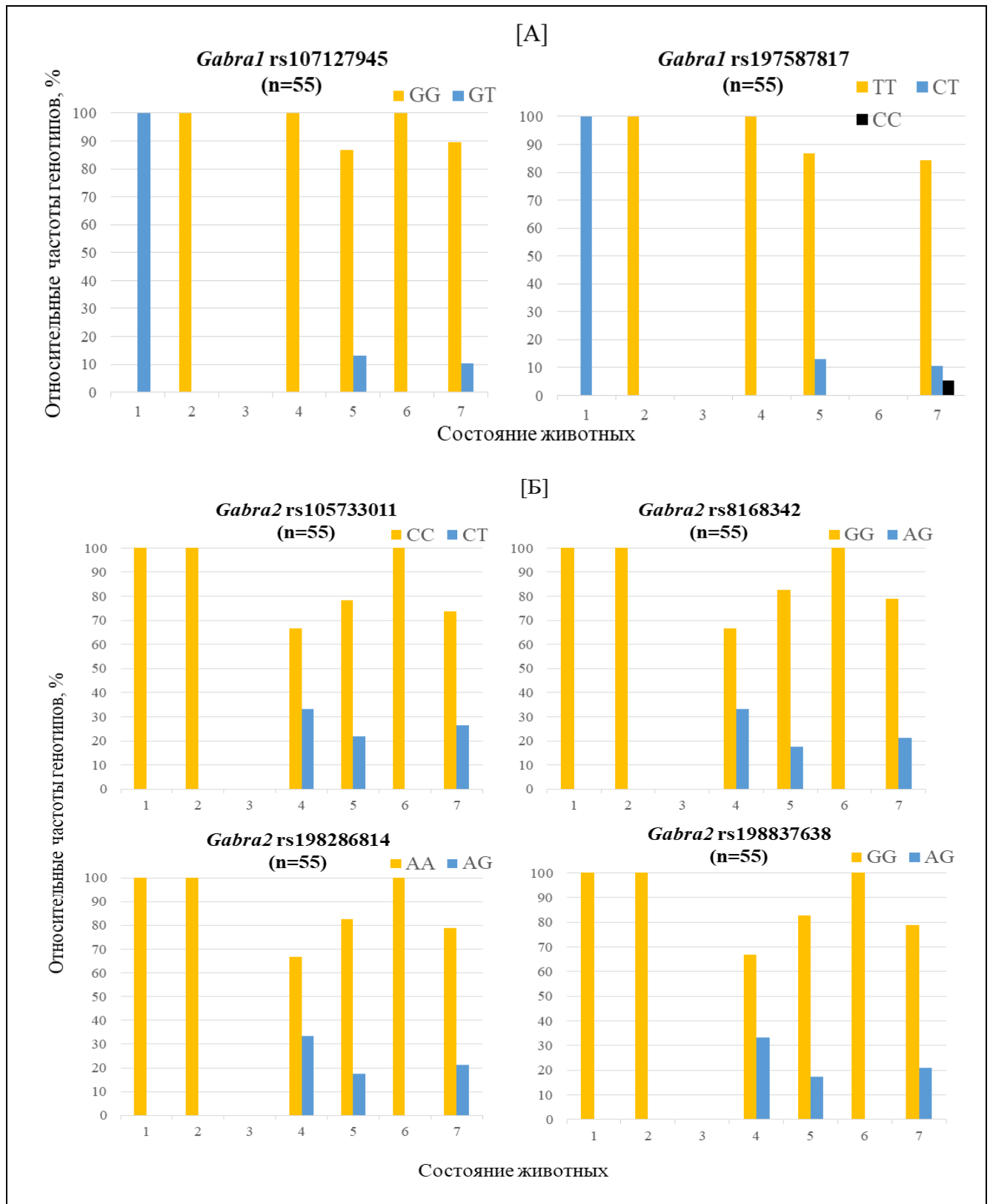
Таким образом, в результате проведенного анализа статистически значимые результаты были выявлены для полиморфизма rs105733011, локализованного в кодирующей части (экзоне) нуклеотидной последовательности гена *Gabra2*. Полученные данные согласуются с данными литературы о том, что данный полиморфизм, являясь синонимичной заменой, может влиять на сплайсинг и стабильность мРНК, что впоследствии приводит к изменению фенотипа [206].

Выявленная ассоциация гетерозиготного генотипа С/Т с риском развития «тяжелой степени интоксикации» может позволить использовать полиморфный локус rs105733011 гена *Gabra2* в качестве маркера, прогнозирующего тяжесть депримирующего действия этанола при острой интоксикации крыс.

4.3.2. Анализ полиморфизма генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* на модели острой интоксикации этанолом предварительно алкоголизованных крыс

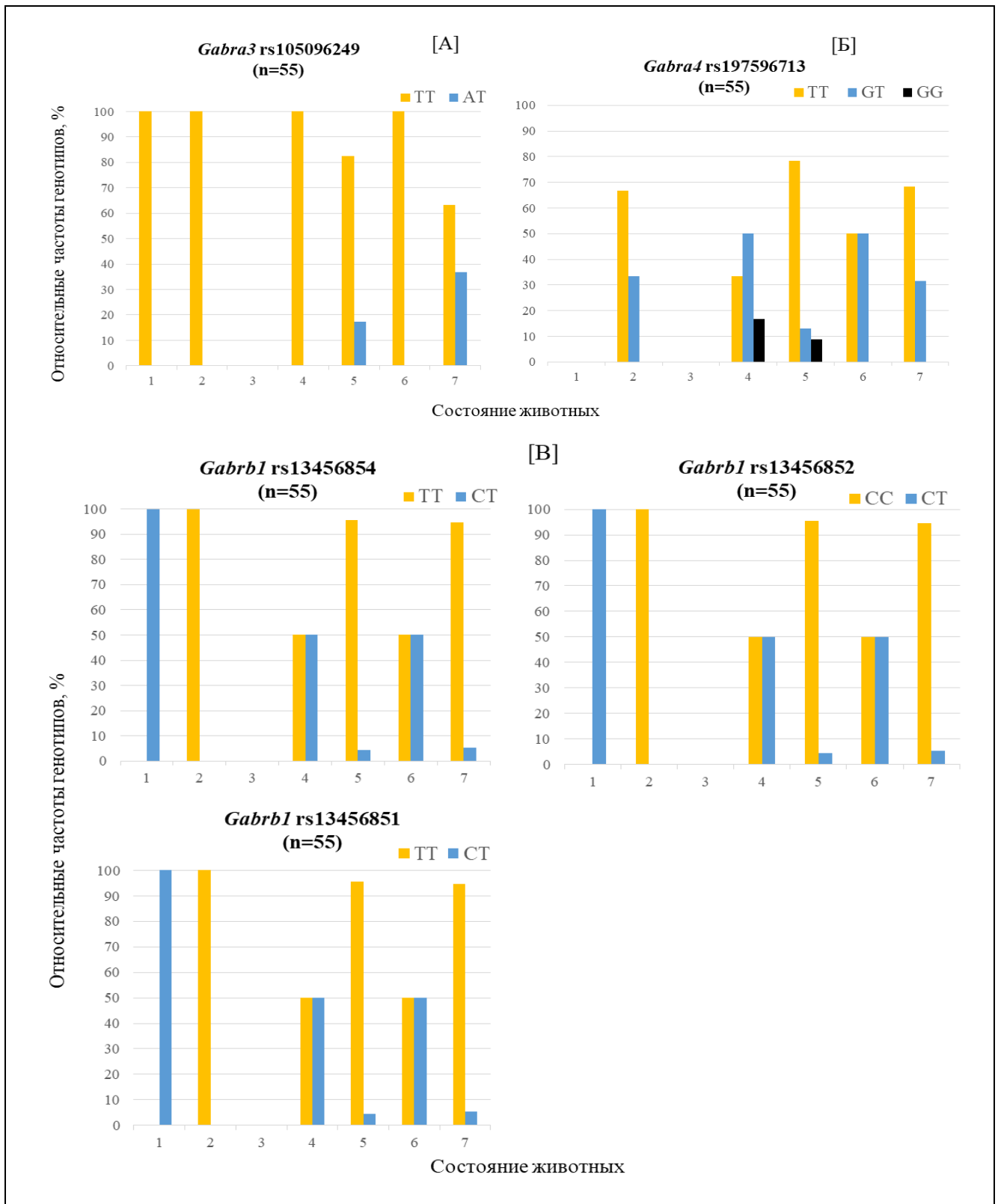
Исходя из того, что степень интоксикации крыс в ответ на острое введение этанола у крыс может быть обусловлена молекулярно-генетическими особенностями, описанными выше (раздел 4.3.1), представлялось важным провести исследования по выявлению связи полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* со степенью угнетения ЦНС на модели острой интоксикации этанолом предварительно алкоголизованных крыс.

Относительные частоты генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в зависимости от состояния предварительно алкоголизованных крыс спустя 3 часа представлены на рисунках 26 и 27.



n – количество животных в группе

Рисунок 26 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra1* (А), *Gabra2* (Б) в зависимости от состояния предварительно алкоголизованных крыс



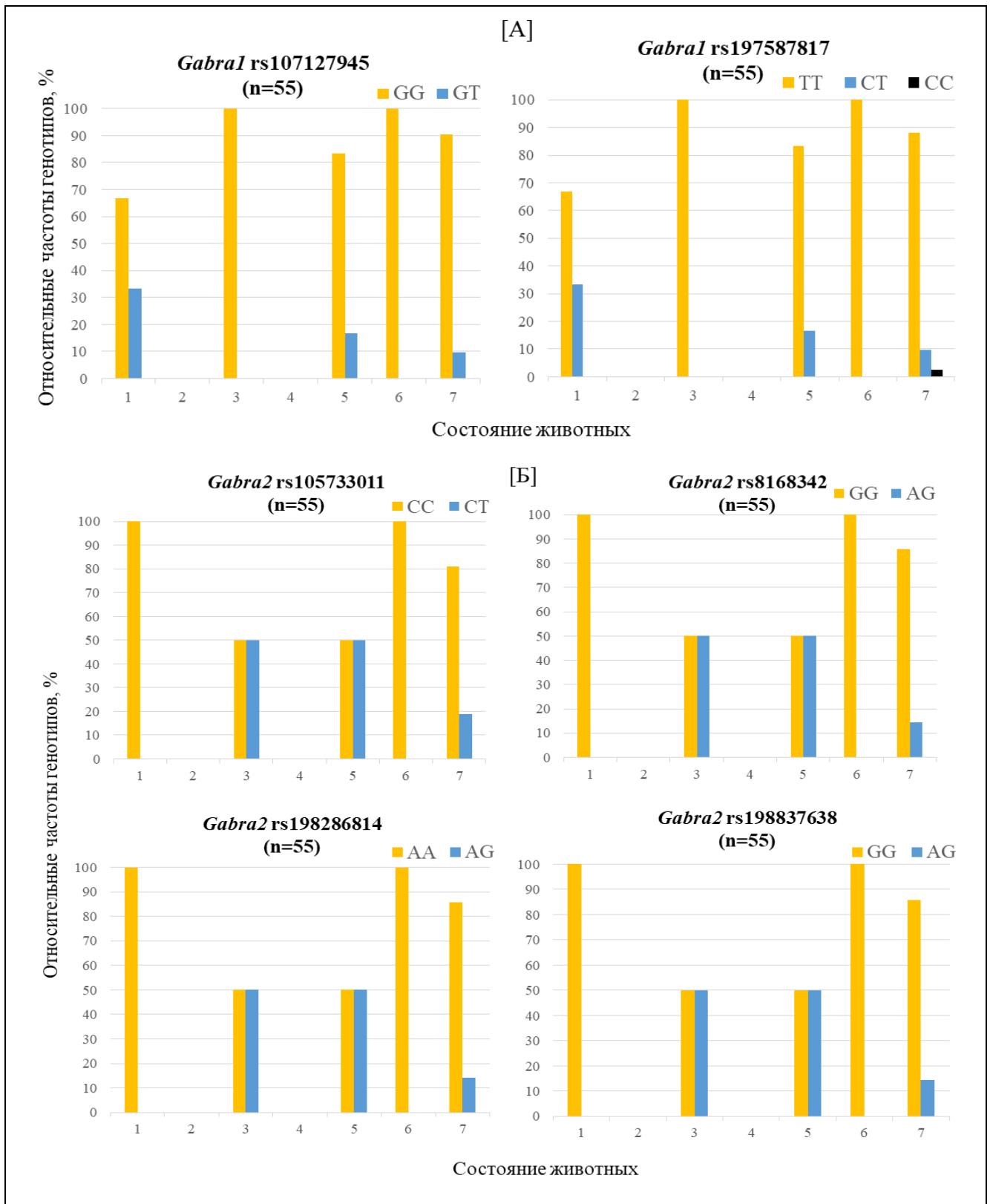
n – количество животных в группе

Рисунок 27 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra3* (A), *Gabra4* (Б) и *Gabrb1* (B) в зависимости от состояния предварительно алкоголизованных крыс

Данные, представленные на рисунках 26 и 27 демонстрируют, что после острого отравления состояние животных (на фоне предварительной алкоголизации) характеризовалось как «физиологическая норма», «оглушение», «умеренная кома», «глубокая кома», «терминальная кома» и «летальный исход».

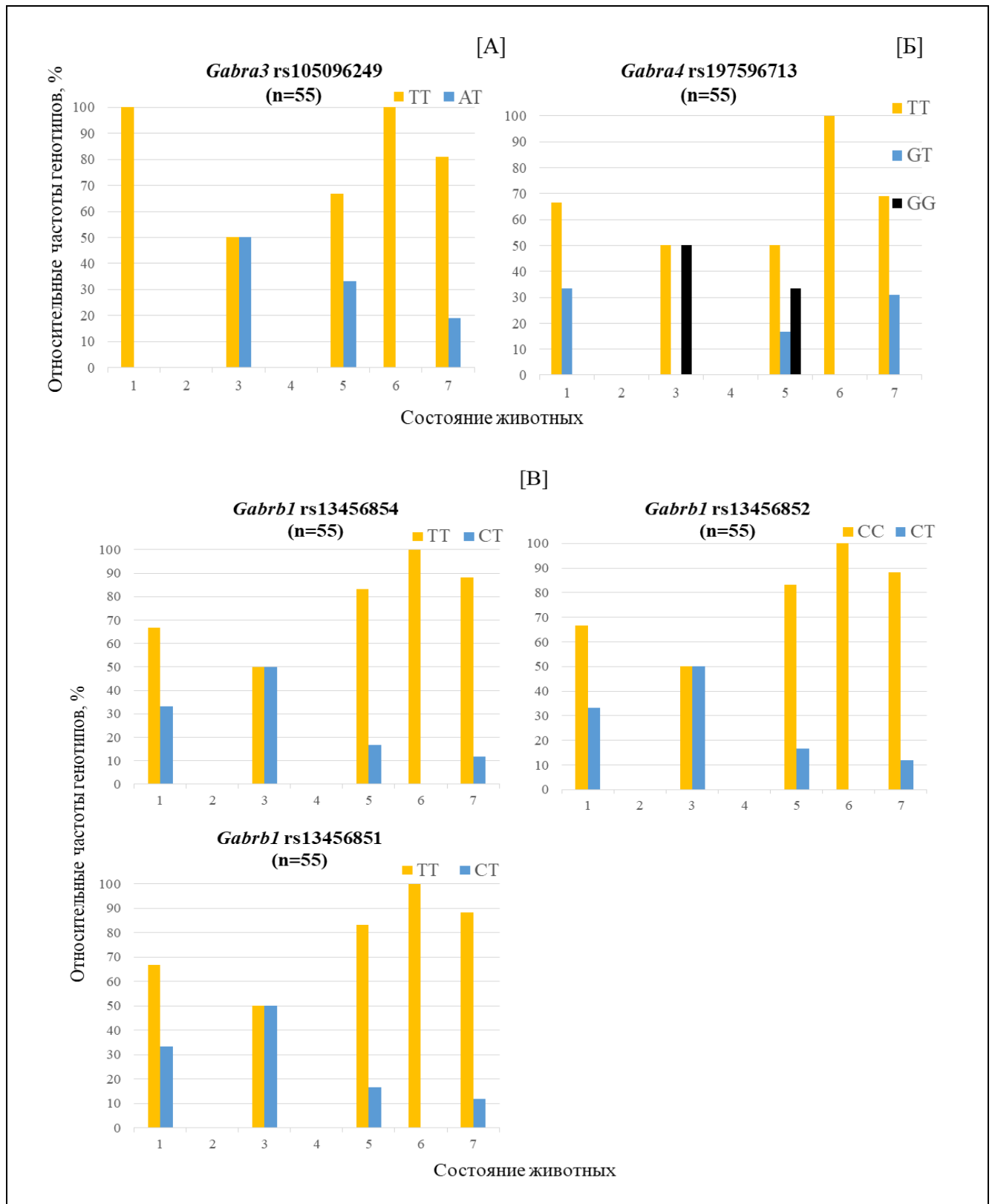
Данная картина распределения состояний у предварительно алкоголизованных крыс отличалась от ранее описанной в разделе 4.3.1 у крыс, перенесших острое отравление этанолом без предшествующей алкоголизации. В случае предварительно алкоголизованных крыс основная часть животных имела показатели ИТНН, соответствующие глубокой коме (42%) и летальному исходу (35%) (рисунок 5, раздел 3.2), а не умеренным характеристикам неврологических показателей, как у крыс, которые не подвергались предварительной алкоголизации.

Кроме того, спустя 8 часов после острого воздействия этанола летальность животных возросла с 35 до 77%, а состояние выживших животных описывалось как физиологическая норма - 5%, сопор - 4%, глубокая и терминальная кома – 11 и 3%, соответственно (рисунки 28, 29).



n – количество животных в группе

Рисунок 28 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra1* (A), *Gabra2* (Б) в зависимости от состояния предварительно алкоголизованных крыс



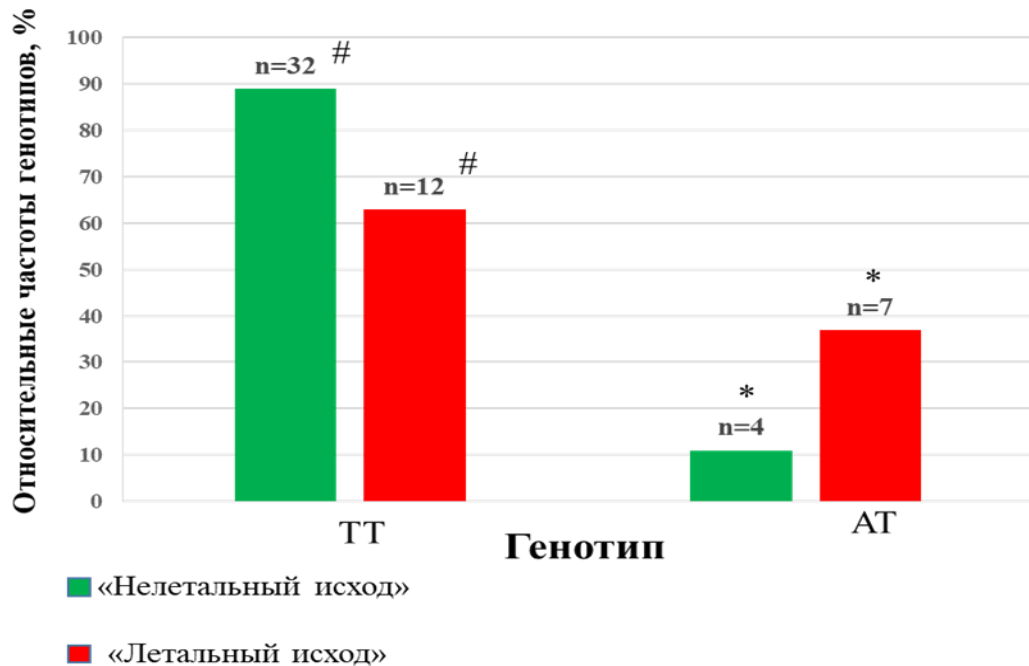
n – количество животных в группе

Рисунок 29 – Относительные частоты генотипов полиморфизмов генов: *Gabra3* (А), *Gabra4* (Б) и *Gabrb1* (В) в зависимости от состояния предварительно алкоголизованных крыс

Через 3 и 8 часов после острого отравления этанолом распределение частот генотипов полиморфных локусов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* у соответствующих групп животных достоверно не отличались. Тем не менее на уровне тенденции отмечено различие частот встречаемости для полиморфизмов *Gabra1* rs107127945, *Gabrb1* rs13456854, *Gabrb1* rs13456852, *Gabrb1* rs13456851 – спустя 3 ч и для полиморфизма *Gabra4* rs197596713 – спустя 8 часов после острого воздействия этанола (приложение А, таблица 3 и таблица 4, соответственно). Учитывая, что количество крыс в некоторых группах с разными состояниями было меньше двух, нами было предложено использовать подход объединения нескольких групп на основании общего признака, описанный нами ранее (раздел 4.3.1) для расширенного поиска ассоциативных связей генотип – выраженность интоксикации.

Принимая во внимание высокую летальность (на фоне предварительной алкоголизации) в исследуемой выборке крыс, была разработана методика оценки выживаемости крыс после острого отравления этанолом с учетом полиморфизмов генов ГАМК_A-рецептора. Для этого анализ распределения частот генотипов проводили у животных, объединенных на основании общего признака – выживаемости крыс спустя 3 часа и 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Таким образом, сравнение частот встречаемости генотипов проводили у животных двух групп: «нелетальный исход» и «летальный исход». При сопоставлении объединенных групп (на основании выживаемости крыс спустя 3 часа после интоксикации) по частотам генотипов обнаружилось, что в группе «летальный исход» частота генотипа *Gabra3** rs10509624*А/Т выше (37% против 11% в группе «нелетальный исход»), а частота генотипа *Gabra3** rs10509624*Т/Т ниже (63 % против 89 % в группе «нелетальный исход»). При этом частоты генотипов по данному полиморфизму статистически значимо ($p=0,035$, $\chi^2 = 5,15$) различались между анализируемыми группами (рисунок 30). Отношение шансов, рассчитанное для группы животных с «летальным исходом» по сравнению с группой выживших крыс, составило 4,66 (95% ДИ 1,16–18,853). Таким образом, наличие у испытуемых генотипа А/Т по гену *Gabra3* по сравнению с генотипом

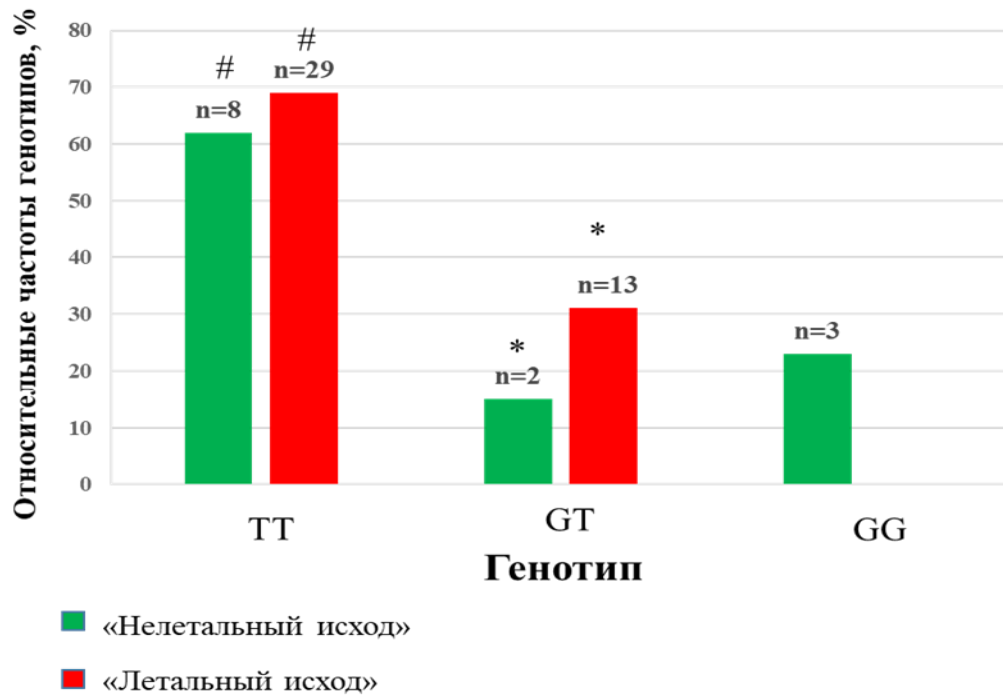
T/T более чем в четыре раза повышает риск гибели крыс спустя 3 часа после острого отравления этанолом.



*, # – значимые ($p < 0,05$) различия между группами животных с различными генотипами; n – количество животных в группе

Рисунок 30 – Распределение генотипов полиморфизма rs105096249 гена *Gabra3* у предварительно алкоголизованных крыс в группах «нелетальный исход» и «летальный исход»

При сравнении частот встречаемости полиморфизмов изучаемых генов среди животных групп «нелетальный исход» и «летальный исход» (спустя 8 ч после введения этанола) были установлены значимые ($p = 0,015$, $\chi^2 = 10,67$) различия в распределении генотипов полиморфизма rs197596713 гена *Gabra4*. А именно, частоты генотипов T/T и G/T были выше в группе невыживших крыс, по сравнению с группой выживших животных – 69% против 62% (для T/T) и 31% против 15 % (для G/T), соответственно (рисунок 31).



*, # – значимые ($p < 0,05$) различия между группами животных с различными генотипами; n – количество животных в группе

Рисунок 31 – Распределение генотипов полиморфизма rs197596713 гена *Gabra4* у предварительно алкоголизованных крыс в группах «нелетальный исход» и «летальный исход»

При объединении носителей генотипов T/T и G/T в одну подгруппу достоверность различий возросла ($p = 0,001$, $\chi^2 = 10,25$), а рассчитанное значение отношения шансов ($OR = 28,33$) позволяет отнести аллель T (генотип T/T и G/T) к факторам риска гибели при остром отравлении этанолом на фоне предварительной алкоголизации.

Для полиморфизмов rs107127945, rs197587817, rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638, rs13456854, rs13456852, rs13456851 отличие частот встречаемости аллельных вариантов у крыс группы «летальный исход» и «нелетальный исход» не достигало уровня статистической значимости.

Таким образом, проведенная оценка влияния полиморфных маркеров генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* на степень выраженности коматозного состояния у экспериментальных животных после острого отравления этанолом позволила выявить наиболее вероятные варианты генов, которые можно

рассматривать как факторы повышенного риска тяжелого течения алкогольной комы.

Для животных, перенесших острое отравление этанолом, обнаружено, что маркером, прогнозирующим тяжесть депримирующего действия этанола при острой интоксикации крыс (спустя 8 ч), является генотип С/Т полиморфного локуса rs105733011 по гену *Gabra2*.

На модели предварительно алкоголизированных крыс выявлены факторы повышенного риска гибели крыс при отравлении этанолом: генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипы Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4* (спустя 8 часов). Стоит отметить, что наиболее тяжелое течение интоксикации у предварительно алкоголизированных крыс (и как следствие формирование иной клинической картины отравления) явилось причиной разработки методического аппарата, позволяющего выявить ассоциацию между генетическими маркерами ГАМК_A-рецепторов и летальностью крыс, отличного от метода оценки степени депримирующего воздействия этанола у крыс, не подвергшихся предварительной алкоголизации.

Обобщая результаты проведенного исследования, мы подтверждаем гипотезу о том, что в формировании ответных реакций организма при острых и хронических интоксикациях этанола задействованы такие наследственные факторы, как уровень экспрессии и полиморфизм генов ГАМК_A-рецептора.

Результаты экспериментальных исследований с использованием двух схем интоксикации (острого отравления на фоне предшествующей алкоголизации и без нее) свидетельствуют о необходимости использования разных генетических маркеров для оценки состояния животных после острого воздействия этанолом.

Наличие того или иного генетического маркера не является основным фактором при прогнозе тяжести отравления, однако его использование в дополнение к существующим подходам повысит прогностическую ценность получаемой информацией и тем самым улучшит точность определения развития тяжести острого поражения этанолом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время проблема алкоголизма остается одной из наиболее актуальных. Ежегодно не менее 2,5 миллиона человек в мире погибают из-за длительного употребления алкоголя [2, 3, 7]. К тому же острые отравления этиловым спиртом прочно удерживают первое место в структуре всех смертельных отравлений [207].

Этанол, обладая депримирующим действием, приводит к повреждению функционирования ряда систем организма человека. Одним из главных нарушений при интоксикациях этиловым спиртом является изменение в регуляции ГАМК-ергической медиаторной системы, приводящее к угнетению деятельности ЦНС и изменению сознания [16, 20]. В настоящее время существует достаточное количество исследований, связанных с изучением биохимических факторов действия этанола на нейромедиаторные системы головного мозга [7, 16]. Однако результатов данных исследований недостаточно для выяснения патогенетических основ токсического воздействия этанолом на ЦНС. В связи с этим многими исследователями признается, что для определения точных механизмов, определяющих глубину депримации ЦНС, необходимо проводить изучение молекулярно-генетических особенностей (уровня экспрессии и полиморфизма генов), которые могут определять реакцию организма после однократного и длительного воздействия этанолом [19, 20, 185]. Экспериментальное исследование генетических маркеров ГАМК_A-рецептора, основного компонента ГАМК-ергической нейромедиаторной системы, вовлеченной в патогенез алкоголизма, послужит основой для установления зависимости степени и признаков депримирующего действия этанола от наследственных факторов. Выявленные генетические маркеры ГАМК_A-рецептора позволят осуществить прогнозирование тяжести течения алкогольной интоксикации при длительном воздействии этанола на нервную систему, а также разработать эффективные схемы диагностики острых состояний отравленных.

В силу этих обстоятельств исследование проводилось в несколько этапов. В начале экспериментальных исследований проводили определение токсикометрического параметра этанола у исследуемых животных. На следующем этапе, основываясь на данных литературы, обосновывали перечень генов-кандидатов, которые могут определять степень тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему лабораторных крыс. Далее проводили изучение влияния острой и хронической интоксикации на уровень экспрессии генов-кандидатов ГАМК_A-рецептора, а также выявляли связь рассчитанных значений УЭ генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола у исследуемых животных спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. На следующем этапе в генах-кандидатах были определены наиболее функционально значимые полиморфные локусы, а также установлено распределение их аллельных вариантов в данной популяции крыс. Далее было проведено генотипирование экспериментальных животных с целью определения ассоциации полиморфизмов с тяжестью депримирующего действия этанола на нервную систему крыс после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. На заключительном этапе исследований устанавливали генетические маркеры ГАМК_A-рецептора, которые определяли глубину тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему животных, перенесших острое отравление на фоне предшествующей алкогольной интоксикации и без нее.

На основании проведенного анализа литературных данных был определен список генов-кандидатов: *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1*. Кодированные этими генами белки (α_{1-6} - и β_1 - субъединицы ГАМК_A-рецептора), вероятно определяющие специфичность действия ионотропного рецептора, вовлечены в биологические процессы, ответственные за формирование токсических эффектов этанола на нервную систему.

В ходе проведенных исследований в образцах крови и печени у всех экспериментальных животных не было выявлено экспрессии изучаемых генов. В тоже время в образцах головного мозга была выявлена экспрессия всех

исследуемых генов – *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1*, за исключением гена *Gabra6*. Экспериментальное исследование влияния острого воздействия этанолом на крыс, подвергшихся предварительной алкоголизации и без нее, позволило установить достоверное изменение уровней экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* в головном мозге животных. При оценке профиля уровней экспрессии генов после острого отравления этанолом было выявлено увеличение экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* (в 3,8, 6,5 и 1,7 раза, соответственно) в головном мозге крыс (без предшествующей алкоголизации), а также увеличение УЭ генов *Gabra5* и *Gabrb1* (в 8,7 и 1,7 раза, соответственно) в головном мозге предварительно алкоголизированных крыс после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Для генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* было обнаружено, что значение уровней экспрессии были выше в головном мозге крыс, перенесших острое отравление по сравнению с животными, употреблявшими этанол в течение одного месяца. Также повышенные значения УЭ для генов *Gabra1* и *Gabra4* были выявлены в головном мозге крыс, перенесших острое отравление этанолом без предварительной алкоголизации, по сравнению с крысами, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации. Для гена *Gabra5* после острого отравления животных (не подвергшихся предшествующей алкоголизации), напротив, установлено меньшее значение УЭ в головном мозге крыс, чем у предварительно алкоголизированных животных. В отношении длительного воздействия этанола регистрировали достоверное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1*.

Полученные данные не противоречат основным представлениям о влиянии острого и длительного воздействия этанола на ГАМК-ергическую систему. Результаты повышения/снижения уровня экспрессии генов рецепторных субъединиц после острого/хронического воздействия этанола подтверждают гипотезу о том, что этанол приводит к разнонаправленным изменениям ГАМК-ергической передачи в зависимости от длительности интоксикации [16]. Значимое увеличение значений УЭ после острого отравления этанолом, по нашему мнению, приводит к активации ГАМК_A рецепторного комплекса в ответ на поступление

этанол. При длительном приеме этанола, напротив, происходит ослабление ГАМК-ергической передачи, а также общее снижение активности ГАМК-ергической системы путем снижения экспрессии генов рецепторных субъединиц в гиппокампе. Увеличение или снижение экспрессии указанных выше генов при воздействии этанола (остром или длительном, соответственно), возможно связано с его влиянием на процесс транскрипции, происходящий в клетках гиппокампа. Вероятно, этанол, в зависимости от длительности интоксикации может выступать в роли позитивного/негативного регулятора транскрипции генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* и вследствие этого приводить к активации/терминации транскрипции и, как следствие, к увеличению/снижению уровня мРНК.

Данные литературы относительно наименования субъединиц, у которых регистрировали изменения уровней экспрессии после интоксикации, несколько противоречивы [191]. В нашем исследовании изменение УЭ генов было установлено для генов, кодирующих α_1 -, α_4 -, α_5 - и β_1 -субъединицы ГАМК_A-рецептора. Авторы объясняют существующие противоречия тем, что эксперименты проводились в разные фазы действия алкоголя и при различных его дозах [19].

Наиболее тяжелым проявлением токсического депримирующего действия этанола на ЦНС является угнетение функций ЦНС с формированием коматозных состояний, разной степени тяжести. Для оценки степени тяжести депримирующего действия этанола в экспериментах была использована балльная система ИТНН, с использованием которой было определено состояние («физиологическая норма»/«оглушение»/«сопор»/«умеренная кома»/«глубокая кома»/«терминальная кома»/«летальный исход») каждого животного после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀.

Использование данной системы позволило выявить связь уровня экспрессии генов ГАМК_A-рецептора в головном мозге выживших крыс (на фоне предварительной алкоголизации и без нее) с тяжестью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после острого воздействия этанолом. Установлено снижение (в 2 раза) уровня экспрессии гена *Gabra2* в головном мозге крыс

(перенесших острое отравление), состояние которых относилось к «сопору», по сравнению с крысами, состояние которых описывалось, как «оглушение». Также выявлено, что уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс, характеризующихся неврологическим статусом «сопор», был выше (в 6 раз) ниже по сравнению с особями, состояние которых относилось к «физиологической норме». Кроме того, показатель УЭ гена *Gabrb1* был достоверно (в 3,5 раза) ниже в группе животных с показателем ИТНН «сопор», по сравнению с животными из группы с состоянием «оглушение». На модели предварительно алкоголизованных крыс установлено, что УЭ гена *Gabra4* в головном мозге животных с показателем ИТНН, соответствующем «глубокой коме», был (в 1,6 раза) ниже, чем у животных, состояние которых относилось к «физиологической норме». Полученные результаты свидетельствуют о том, что тяжесть депримирующего воздействия этанола на нервную систему крыс, перенесших острое отравление этанолом, как на фоне предварительной алкоголизации, так и без нее, связана с изменением уровня экспрессии генов, кодирующих соответствующие субъединицы ГАМК_A-рецептора. В литературе содержится достаточно сведений об изменении уровня экспрессии генов ГАМК_A рецепторного комплекса, при приеме алкоголя и алкогольной зависимости [24, 26,]. При изучении посмертных образцов головного мозга (гиппокампа) у людей, страдающих алкогольной зависимостью, установлены пониженные значения уровней экспрессии генов, кодирующих α_2 - и α_3 -субъединицы [208]. Однако собственно работ о состоянии уровня экспрессии генов у исследуемых больных с разной степенью тяжести интоксикации не представлено. Выявленное, в ходе данной работы, снижение уровня экспрессии генов в головном мозге крыс, перенесших тяжелую форму острого отравления этанолом, может лежать в основе нейротоксических поражений, приводящих к нарушению поведения, а также двигательной функции животных.

Анализ данных, приведенных в базах данных Национального Центра Биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, NCBI), позволил выявить наличие полиморфизма ДНК *Gabra1*,

Gabra2, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1*. Для гена *Gabra5*, обнаруженное отсутствие полиморфизмов в популяции крыс, вероятно, являлось следствием консервативности его нуклеотидной последовательности. На основании информационно-теоретического поиска среди множества полиморфных локусов для исследования были отобраны 16 наиболее функционально значимых полиморфизмов, расположенных в разных частях генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора. Проведенное генотипирование образцов ДНК лабораторных животных позволило установить генетическое разнообразие для 11 (из 16 исследуемых) полиморфизмов: *Gabra1* (rs107127945, rs197587817); *Gabra2* (rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638); *Gabrb1* (rs13456854, rs13456852, rs13456851); *Gabra3* (rs105096249); *Gabra4* (rs197596713).

Данные о полиморфизме генов крыс дополнялись результатами изучения их уровней экспрессии. Установлено, что полиморфизмы, обусловленные заменой A/G (rs8168342, rs198286814 и rs198837638) по гену *Gabra2* и C/T (rs13456854, rs13456852 и rs13456851) по гену *Gabrb1*, ассоциированы с пониженным значением уровня экспрессии соответствующих генов в головном мозге интактных крыс. Гетерозиготный генотип C/T**Gabrb1* (rs13456854, rs13456852 и rs13456851) ассоциирован со снижением уровня экспрессии гена *Gabrb1* у крыс, получавших этанол в течение месяца. У предварительно алкоголизованных крыс после острого воздействия этанолом, напротив, выявлено, что гетерозиготные генотипы G/T**Gabra1* (rs107127945) и C/T**Gabra1* (rs197587817) ассоциированы с повышенным уровнем экспрессии гена *Gabra1*.

Сравнительный анализ распределения генотипов по каждому полиморфизму между группами животных, характеризующихся разными состояниями, после острого воздействия этанола, позволил установить ассоциацию полиморфных локусов со степенью интоксикации у крыс, перенесших острое отравление этанолом, а также определить полиморфизмы, определяющие повышенный риск гибели предварительно алкоголизованных крыс после введения этанола в дозе 0,8ЛД₅₀. В результате проведенных исследований, обнаружено, что наличие у крыс, перенесших острое отравление

этанолом, гетерозиготного генотипа С/Т полиморфизма rs105733011, локализованного в кодирующей части нуклеотидной последовательности гена *Gabra2*, определяет «тяжелую степень интоксикации» спустя 8 часов после острого отравления этанолом. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что данный полиморфизм, являясь синонимичной заменой, может влиять на сплайсинг и стабильность мРНК, что впоследствии приводит к изменению фенотипа [206].

На модели предварительно алкоголизованных крыс выявлено, что генотипы А/Т (rs105096249) по гену *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипы Т/Т и G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4* (спустя 8 часов) ассоциированы с повышенным риском гибели животных. Исследования, направленные на изучение ассоциации генетических маркеров с тяжестью депримирующего действия этанола немногочисленны. Среди проводимых научных работ большая часть посвящена поиску генетических маркеров предрасположенности к алкоголизму. В исследовании Н.Ж. Edenberg была показана достоверная ассоциация для 31 SNP (из 48-ми исследованных однонуклеотидных замен гена *Gabra2*) с развитием алкогольной зависимости [86]. Связь степени тяжести алкогольного поражения печени у человека была выявлена только для генотипа С1/С2 гена *CYP2E1* [78]. Таким образом, несмотря на научные достижения в области молекулярной генетики, токсикологии, клиники и лечения острых отравлений этанолом, до сих пор прогноз степени угнетения функций ЦНС после воздействия токсиканта не включает в себя учет генетических маркеров ГАМК_A-рецептора. Разработанный нами методический аппарат, позволяющий оценить вклад полиморфизмов в развитие той или иной степени интоксикации, а также определить исход интоксикации, позволил установить молекулярно-генетические маркеры для оценки состояния животных после острого воздействия этанолом на крыс на фоне предварительной алкоголизации и без нее. Для животных, перенесших острое отравление этанолом, обнаружено, что маркером, определяющим тяжесть депримирующего действия этанола при острой интоксикации крыс (спустя 8 ч), является генотип С/Т полиморфного локуса rs105733011 по гену *Gabra2*. На

модели предварительно алкоголизованных крыс выявлены факторы повышенного риска гибели крыс при отравлении этанолом: генотип А/Т полиморфного локуса rs10509624 по гену *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипы Т/Т, G/Т полиморфного локуса rs197596713 по гену *Gabra4* (спустя 8 часов).

В общем, данное исследование позволило подтвердить предположение о том, что токсическое действие этанола на организм, побочные эффекты, возникающие после отравления токсикантом, а также тяжесть депримирующего действия этанола на ЦНС определяется не только дозой, способами поступления алкоголя, но и индивидуальными характеристиками организма. Для определения молекулярно-генетических маркеров, определяющих степень тяжести при острой и хронической интоксикации этанолом, нами было проведено изучение влияния этанола на нервную систему лабораторных животных в зависимости от генетических особенностей ГАМК_A-рецептора. В итоге были выявлены закономерности изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, после острого и хронического воздействия этанолом, которые позволили расширить теоретические представления о депримирующем действии токсиканта на ГАМК-ергическую нейромедиаторную систему. Наши данные о связи уровня мРНК ряда субъединиц ГАМК_A-рецептора со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, а также с большей выраженностью тяжести проявлений интоксикации этанолом являются новыми и дают основания для более детальных экспериментальных исследований. Кроме того, полученные в работе данные о связи полиморфизмов генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, с глубиной депримирующего эффекта этанола на нервную систему могут послужить систематической основой для определения исхода алкогольной интоксикации при длительном воздействии этанола на нервную систему, а также установления степени интоксикации острых состояний отравленных животных.

Подводя итог, можно сказать, что результаты, полученные на экспериментальных животных, позволили показать важную роль генетических маркеров ГАМК_A-рецептора в определении глубины тяжести депримирующего

действия этанола на нервную систему. Кроме того, можно предполагать, что существующие врожденные, наследуемые особенности структуры генов, кодирующих ГАМК_A-рецептора, которые определяют степень интоксикации у крыс, также смогут обуславливать различия в реакции организма на этанол у людей. Дальнейшие исследования в данной области, вероятно, смогут более полно прояснить взаимосвязь между генотипами генов, кодирующих ГАМК_A-рецептор, и реакцией организма человека при действии этанола. Особый научный интерес может представлять разработка алгоритма генетического прогнозирования депримирующего действия этанола на ЦНС организма человека с целью его применения для профессионального отбора сотрудников, чья работа связана непосредственно с контактом токсиканта, а также для клинической оценки степени интоксикации состояния отравленных индивидуумов.

Обобщая, можно говорить о том, что результаты проведенного исследования представляют теоретическую и экспериментально-методическую основу персонализированной медицины. Кроме того, молекулярно-генетические методы, используемые в данной работе, являются одними из превалирующих в изучении биологических аспектов жизнедеятельности организмов. Таким образом, можно предполагать, что полученные результаты исследования будут являться основой для разработки дополнительных медицинских и профилактических мероприятий, основанных на использовании генетических особенностей организма. Изучение молекулярно-генетических особенностей генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, а также использование их в качестве маркеров прогнозирования исхода интоксикации может быть предметом будущих исследований.

В результате данного исследований решена научная задача по определению молекулярно-генетических особенностей ГАМК_A-рецептора, с которыми связана степень тяжести интоксикации этанолом. В ходе выполнения диссертационной работы получены следующие **выводы**:

ВЫВОДЫ

1. Острая и хроническая интоксикации этанолом влияют на уровни мРНК альфа (α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_4 -, α_5 -, α_6 -) и бета (β_1) -субъединицы ГАМК_A-рецептора крыс в гиппокампе лабораторных животных. Существуют различия в изменениях уровней мРНК ряда субъединиц в гиппокампе крыс в зависимости от схем экспериментальной интоксикации.

2. Уровень мРНК ряда субъединиц ГАМК_A-рецептора связан со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, а также с большей выраженностью тяжести проявлений интоксикации этанолом у лабораторных крыс.

3. Установлено генетическое разнообразие аллельных вариантов для 11 полиморфизмов: *Gabra1* (rs107127945, rs197587817); *Gabra2* (rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638); *Gabrb1* (rs13456854, rs13456852, rs13456851); *Gabra3* (rs105096249); *Gabra4* (rs197596713).

4. Комбинации аллелей генов *Gabra2*, *Gabra3* и *Gabra4* определяют глубину тяжести угнетения ЦНС на модели острой интоксикации этанолом крыс.

5. Значимым молекулярным маркером для определения «тяжелой степени интоксикации» спустя 8 часов после острого отравления этанолом крыс является генотип С/Т (rs105733011) по гену *Gabra2*.

6. Маркерами повышенной гибели предварительно алкоголизованных крыс спустя 3 часа после острого отравления этанолом является генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3*, спустя 8 часов – аллельные комбинации Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты выполненных исследований рекомендуется использовать:

- для установления критериев тяжести алкогольной интоксикации на этапе доклинической оценки глубины депримирующего действия этанола на нервную систему при острых отравлениях этанолом;
- для разработки методических рекомендаций по установлению исхода алкогольной интоксикации на модели животных, перенёсших острые отравления алкоголем на фоне предварительной алкоголизации;
- для разработки прогностических маркеров степени индивидуального биологического риска при острых и хронических интоксикациях этанолом;
- для обоснования комплекса лечебно-восстановительных мероприятий (применяемых после алкогольных отравлений) при проведении их доклинических исследований.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Аллель – одна из нескольких альтернативных структурных форм (состояний) гена, каждая из которых характеризуется уникальной последовательностью нуклеотидов:

- «дикого типа» (нормальная, мажорная): аллель, встречающаяся с наиболее высокой частотой в определенной популяции;

- «редкого типа» (мутантная, минорная): аллель, встречающаяся с более низкой частотой в отличие от аллеля «дикого типа» в определенной популяции.

Гаплотип – совокупность аллелей на локусах одной хромосомы.

Ген – элементарная единица наследственности, наименьший неделимый элемент наследственного материала, который может быть передан от родителей потомству как целое и который определяет признаки, свойства или физиологическую функцию организма. На молекулярном уровне – это участок молекулы ДНК, кодирующий первичную структуру белков и РНК.

Генетический маркер – участок ДНК с известной локализацией.

Геном – полная генетическая система клетки, определяющая характер онтогенетического развития организма и наследственную передачу в ряду поколений всех его структурных и функциональных признаков.

Генотип – комбинация аллелей определенного гена; совокупность всех генов (элементов генома) организма.

Генотипирование – определение аллельного состояния локуса (гена); характеристика аллеля на уровне нуклеотидной последовательности ДНК.

Гетерозигота – особь с двумя различными типами (диким и редким) аллелей в определенном локусе.

Гомозигота – особь с аллелями одинакового типа (дикими или редкими) в определенном локусе.

Интроны – участки ДНК, расположенные между экзонами; регулируют образование различных мРНК по принципу «один ген – несколько функциональных продуктов» за счет альтернативного сплайсинга.

Локус – участок ДНК, где расположена определенная генетическая детерминанта.

Матричная РНК (мРНК) – молекула РНК, содержащая информацию о последовательности аминокислот в белке; является транскриптом гена, кодирующего соответствующий белок.

Мутация – изменение в последовательности ДНК.

Полиморфизм – многообразие нуклеотидных последовательностей, в том числе и аллельных форм гена. Полиморфным считается ген, имеющий два и более аллелей.

Полиморфный вариант – одна из альтернативных форм гена в популяции.

Сайт – определенное место в молекуле ДНК.

Сплайсинг – процесс формирования зрелой мРНК или функционального белка путем удаления интронов.

Фенотип – совокупность признаков организма.

Хромосомы – дискретные внутриядерные структуры, содержащие молекулы ДНК, суперскрученные за счет взаимодействия с гистоновыми белками.

Экзон – фрагмент гена, кодирующий аминокислотную последовательность и остающийся в зрелой мРНК после транскрипции и удаления интронов.

Экспрессия гена – это процесс, в котором наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ	— Аденозинтрифосфорная кислота
ГАМК	— Гаммааминомасляная кислота
ГАМК _A - рецептор	— Рецептор гаммааминомасляной кислоты типа А
ГКГ	— Главный комплекс гистосовместимости
ГЭБ	— Гематоэнцефалический барьер
ДНК	— Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИТНН	— Индекс тяжести неврологических нарушений
кДНК	— Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛД ₅₀	— Среднелетальная доза
мРНК	— Матричная рибонуклеиновая кислота
мтДНК	— Митохондриальная дезоксирибонуклеиновая кислота
ОТ	— Обратная транскрипция
ПЦР	— Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	— Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК	— Рибонуклеиновая кислота
рРНК	— Рибосомальная рибонуклеиновая кислота
тРНК	— Транспортная рибонуклеиновая кислота
УЭ	— Уровень экспрессии
цАМФ	— Циклический аденозинмонофосфат
ЦНС	— Центральная нервная система
ЭДТА	— Этилендиаминтетрауксусная кислота
<i>18s рРНК</i>	— ген, кодирующий 18s-субъединицу рибосомальной РНК
μ - OPRM1	— Белок опиоидного рецептора μ типа
3' - UTR	— 3' - нетранслируемая регулируемая область

<i>5-HTT</i>	— Ген рецептора транспортера серотонина человека
<i>ADH</i>	— Ген алкогольдегидрогеназы человека
<i>ADH1B</i>	— Ген бета-субъединицы алкогольдегидрогеназы человека
<i>ADH7</i>	— Ген алкогольдегидрогеназы 7 человека
<i>ALDH2</i>	— Ген альдегиддегидрогеназы 2 человека
<i>AMY1</i>	— Ген амилазы 1 человека
<i>ANP</i>	— Ген предсердного натрийуретического пептида человека
<i>AVP</i>	— Ген вазопрессина человека
<i>BDNF</i>	— Ген нейротрофического фактора головного мозга человека
<i>BDZ</i>	— Бензодиазепины
<i>CI 95%</i>	— Доверительный интервал с вероятностью 95%
<i>COMT</i>	— Ген катехол-о-метилтрансферазы человека
<i>Ct</i>	— пороговый цикл
<i>CYP2C9</i>	— Ген цитохрома P450 типа 2C9 человека
<i>CYP2E1</i>	— Ген цитохрома P450 типа 2E1 человека
<i>CYP2E15B</i>	— Ген цитохрома P450 типа 2E15B человека
<i>DAT</i>	— Ген дофаминового транспортера человека
<i>ddNTP</i>	— Дидезоксинуклеозидтрифосфаты
<i>DNMT</i>	— ДНК метилтрансфераза
<i>DRD2</i>	— Ген рецептора дофамина человека
<i>ETF</i>	— Этифоксин
<i>Gabra1</i>	— Ген α_1 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>Gabra2</i>	— Ген α_2 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>Gabra3</i>	— Ген α_3 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>Gabra4</i>	— Ген α_4 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>Gabra5</i>	— Ген α_5 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>Gabra6</i>	— Ген α_6 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы

<i>Gabrb1</i>	— Ген β_1 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
GABRB2	— β_2 -субъединица ГАМК _A -рецептора
GABRD	— δ -субъединица ГАМК _A -рецептора
GABRE	— ε -субъединица ГАМК _A -рецептора
<i>Gabrg2</i>	— Ген α_1 -субъединицы ГАМК _A -рецептра крысы
GABRG2	— γ_2 -субъединица ГАМК _A -рецептора
GABRG3	— γ_3 -субъединица ГАМК _A -рецептора
GABRP	— π -субъединица ГАМК _A -рецептора
GABRQ	— θ -субъединица ГАМК _A -рецептора
GFAP	— Глиальный фибриллярный кислый протеин
<i>HERP</i>	— Ген гомоцистеин-индуцированного ER протеина человека
<i>MAOA</i>	— Ген моноаминоксидазы А человека
NF- κ B	— Транскрипционный ядерный фактор каппа-В
<i>NGF</i>	— Ген фактора роста нервов человека
NMDA	— N-метил-D-аспартат рецептор
<i>NR2B</i>	— Ген рецептора N-метил-D-аспартата типа 2b человека
NS	— Нейростероиды
<i>PDYN</i>	— Ген продинорфина человека
<i>POMC</i>	— Ген проопиомеланокортина человека
RGB	— База данных геномов позвоночных и других эукариот
S-100	— Специфический белок астроцитарной глии
SAH	— S-аденозил гомоцистеин
SAM	— S-аденозилметионина
<i>SNCA</i>	— Ген альфа синуклеина человека
SNP	— Однонуклеотидный полиморфизм, single-nucleotide polymorphism
SNPDB	— База данных однонуклеотидных полиморфизмов
<i>VKORC1</i>	— Ген субъединицы 1 витамин-K-эпоксидредуктазы человека

МНО	— Показатель свертывания крови
<i>TH</i>	— Ген тирозингидроксилазы человека
ТН	— Тирозингидроксилаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Башарин, В. А. Нейропептиды и субстраты энергетического обмена в терапии тяжелых отравлений депримирующими веществами (экспериментальное исследование) : дисс. ... докт. мед. наук : 14.03.04 / Башарин Вадим Александрович. – СПб., 2011. – 298 с.

2 Остапенко, Ю. Н. Основные причины смертности населения России от острых отравлений химической этиологии / Ю. Н. Остапенко, Н. Н. Литвинов, И. В. Батунова [и др.] // 3-й съезд токсикологов России : тез. докл. – М., 2008. – С. 22-24.

3 Акалаев, Р. Н. Острые отравления алкоголем. Эпидемиология, диагностика, Лечение и анализ нерешенных проблем / Р. Н. Акалаев, А. А. Стопницкий, Х. Ш. Хожиев // Вестник экстренной медицины. – 2017. – №1. – С. 104-111.

4 Петров, А. Н. Проблемы диагностики нейротоксических нарушений – последствий отравлений веществами судорожного действия / А. Н. Петров // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2017. – № 3 (59). – С. 211-217.

5 Решетов, М. В. Особенности течения эндотоксикоза у больных, страдающих психическими расстройствами, при острых отравлениях ядами нейротропного действия : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.20, 14.00.18 / Решетов Михаил Викторович. – СПб., 2009. – 24 с.

6 Лужников, Е. А. Неотложные состояния при острых отравлениях (диагностика, клиника, лечение) / Е. А. Лужников, Ю. Н. Остапенко, Г. Н. Суходолова. – Москва : Медпрактика, 2001. – 219 с.

7 Александровский, В. Н. Острое отравление этиловым алкоголем (алкогольная кома) / В. Н. Александровский, Ю.Н. Остапенко, Ю.С. Гольдфарб [и др.] // НМП. – 2018. – №4. – С. 357-365.

8 Ливанов, Г. А. Метаболические нарушения у больных с острыми отравлениями этанолом на фоне хронического алкоголизма и пути их фармакологической коррекции / Г. А. Ливанов, А. Н. Лодягин, С. В. Лубсанова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2015. – №4-2 (115). – С. 64-68.

9 Tabakoff, B. The neurobiology of alcohol consumption and alcoholism: an integrative history / B. Tabakoff, P. L. Hoffman // Pharmacol. Biochem. Behav. – 2013. – № 111. – P. 132-136.

10 Заиграев, Г. Г. Проблемы алкоголизации населения России / Г. Г. Заиграев // Наркология. – 2002. – № 7. – С. 2-7.

11 Долгополова, Т. В. Алкогольные поражения нервной системы / Т. В. Долгополова, В. А. Куташов // Молодой ученый. – 2015. – № 21. – С. 269 – 274.

12 Гришин, В. А. Патогенетические механизмы нарушений иммунного статуса после алкогольной интоксикации и их фармакологическая коррекция: дисс. ... канд. мед. наук: 14.03.03 / Гришин Владимир Александрович. – С., 2011. – 148 с.

13 Бонитенко, Е. Ю. Острые отравления лекарственными средствами и наркотическими веществами / Е. Ю. Бонитенко, С. П. Нечипоренко. – СПб. : Элби, 2010. – 440 с.

14 Долго-Сабуров, В. Б. О роли окислительного стресса в формировании цитотоксических эффектов этанола / В. Б. Долго-Сабуров, А. Н. Петров, В. А. Беляев // Токсикологический вестник. – 2010. – № 1. – С. 6-10.

15 Табакофф, Б. Нейробиологические эффекты алкоголя / Б. Табакофф, Л. Хоффман // Вопросы наркологии. – 2003. – № 5. – С. 27-42.

16 Шабанов, П. Д. Наркология: Руководство для врачей / П. Д. Шабанов. – М. : Геотар-медиа, 2003. – 560 с.

17 Edenberg, H. J. Genetics and alcoholism / H. J. Edenberg, T. Foroud // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2013. – № 10 (8). – P. 487-494.

18 Herman, M. A. Enhanced GABAergic transmission in the central nucleus of the amygdala of genetically selected Marchigian Sardinian rats: alcohol and CRF effects / M. A. Herman, M. Kallupi, G. Luu, C. S. Oleata [et al.] // *Neuropharmacology*. – 2013. – № 67. – P. 337-348.

19 Востриков, В. В. Биохимические маркеры алкогольной и опиатной зависимости / В. В. Востриков, В. П. Павленко, П. Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2004. – №3. – С. 3-49.

20 Dick, D. M. Association between GABRA1 and drinking behaviors in the collaborative study on the genetics of alcoholism sample / D. M. Dick, J. Plunkett, L. F. Wetherill [et al.] // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2006. – №7 (30). – P. 1101-1110.

21 Pierucci-Lagha, A. GABRA2 alleles moderate the subjective effects of alcohol, which are attenuated by finasteride / A. Pierucci-Lagha, J. Covault, R. Feinn, M. Nellissery [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2005. – №6 (30). – P. 1193-1203.

22 Li, D. Association of Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor a2 Gene (GABRA2) with Alcohol Use Disorder / D. Li, A. Sulovari, C. Cheng [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2014. – №4 (39). – P. 907-918.

23 Pignataro, L. The regulation of neuronal gene expression by alcohol / L. Pignataro, F. P. Varodayan, L. E. Tannenholz [et al.] // *Pharmacol. Ther.* – 2009. – №3 (124). – P. 324-335.

24 Davies, M. The role of GABA_A receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system / M. Davies // *J. Psychiatry Neurosci.* – 2003. – № 4 (28). – P. 263-274.

25 Головкин, А. И. Нейрохимия синдрома психической зависимости при аддиктивных болезнях химической этиологии / А. И. Головкин, С. И. Головкин, Л. В. Леонтьева // *Нейрохимия*. – 2006. – № 1. – С. 5-18.

26 Petrie, J. Altered gaba_A receptor subunit and splice variant expression in rats treated with chronic intermittent ethanol / J. Petrie, D. W. Sapp, R.F. Tyndale [et al.] // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2001. – № 6 (25). – P. 819-828.

27 Лисицкий, Д. С. Фармакологическая коррекция последствий нейротоксических поражений при тяжёлых формах острых отравлений этанолом (экспериментальное исследование) : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.03; 14.03.06 / Лисицкий Дмитрий Сергеевич. – СПб., 2013. – 153 с.

28 Коротун, В. Н. Пути и механизмы биотрансформации этанола / В. Н. Коротун, В. И. Витер, В. В. Лесников // Мед. экспертиза и право. – 2013. – № 1. – С. 33-36.

29 Садовникова, И. И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения / И. И. Садовникова // Русский медицинский журнал. – 2003. – Т. 5. – № 2. – С. 37.

30 Батоцыренова, Е. Г. Влияние полуметальной дозы этанола на активность НА,К-АТФАЗЫ мозга крыс / Е. Г. Батоцыренова, В. А. Кашуро // В сборнике: Закономерности к тенденции развития науки в современном обществе. – 2013. – С. 43-47.

31 Травенко, Е. Н. Отравления этанолом и алкоголь-ассоциированная патология внутренних органов [Электронный ресурс] / Е. Н. Травенко // Кубанский научный медицинский вестник. – 2016. – №2. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/otravleniya-etanolom-i-alkogol-assotsiirovannaya-patologiya-vnutrennih-organov>.

32 Машанов, А. В. Острое отравление этанолом и его комплексное повреждающее действие на функциональные возможности печени / А. В. Машанов, Г. Г. Юшков, В. В. Бенеманский [и др.] // Бюл. ВЦНС СО РАМН. – 2013. – № 6 (94). – С. 153-157.

33 Зупанец, И. А. Фармацевтическая опека: клинико-фармацевтические аспекты применения алкоголя в медицине [Электронный ресурс] / И. А. Зупанец, Н. В. Бездетко, Л. В. Деримедведь // Провизор. – 2003. – № 4. – Режим доступа: http://www.provisor.com.ua/archive/2003/N4/art_27.php.

34 Маркизова, Н. Ф. Спирты: Серия "Токсикология для врачей" / Н. Ф. Маркизова, А. Н. Гребенюк, В. А. Башарин, Е. Ю. Бонитенко. – СПб. : «Издательство Фолиант», 2004. – 112 с.

35 Куценко, С. А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание / С. А. Куценко. – СПб. : «Издательство Фолиант», 2004. – 720 с.

36 Халютин, Д. А. Экспериментальная оценка эффективности применения пептидных препаратов при отравлении этиловым спиртом : дисс. ...канд. мед. наук : 14.03.04, 14.03.06 / Халютин Денис Александрович. – СПб., 2015. – 179 с.

37 Корытин, С. Животные - наркотики – человек. Тигр под наркозом. / С. Корытин. – М. : «URSS», 2013. – 248 с.

38 Бонитенко, Ю. Ю. Острые отравления этанолом и его суррогатами / Ю. Ю. Бонитенко. – СПб. : Изд-во «ЭЛБИ-СПБ», 2005. – 225 с.

39 Davis, K. L. Neuropsychopharmacology – The fifth generation of progress. / K. L. Davis, D. Charney, J. T. Coyle [et al.]. – Philadelphia. : « ISBN», 2002. – 2080 p.

40 Лелевич, С. В. Нейрохимические аспекты алкогольной интоксикации / С. В. Лелевич, И. М. Величко, В. В. Лелевич // Журнал ГрГМУ. – 2017. – №4. – С. 375-380.

41 Шилов, В. В. Особенности фармакологической коррекции токсической гепатопатии при тяжелых формах острых отравлений алкоголем на фоне длительного злоупотребления (запоев) / В. В. Шилов, С. А. Васильев, И. А. Шикалова, Б. В. Батоцыренов // Рус. Мед. журн. – 2010. – № 18. – С. 3-6.

42 Афанасьев, В. В. Острая интоксикация этиловым спиртом. Санкт-Петербургская Ассоциация клинической фармакологии и клинической токсикологии / В. В. Афанасьев. – СПб. : «Интермедика», 2002. – 96 с.

43 Федотова, И. Н. Нейротоксичность при острых отравлениях / И. Н. Федотова, Т. А. Васина, А. А. Белопольский [и др.] // Журнал «Земский Врач». – 2013. – №1 (18). – С. 32-34.

44 Кашуро, В. А. Изучение нейротрофических маркеров при острых тяжелых отравлениях этанолом / В. А. Кашуро, Е. Г. Батоцыренова, М. Б. Иванов

[и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. № 78 (S). – С. 31.

45 Стрекалова, О. С. Коматозные состояния: Этиопатогенез, экспериментальные исследования, лечение гепатической комы / О. С. Стрекалова, В. Ф. Учайкин, О. М. Ипатова [и др.] // Биомед. химия. – 2009. – № 55 (4). – С. 380-396.

46 Бонитенко, Е. Ю. Оценка неврологического статуса при острой алкогольной интоксикации в эксперименте / Е. Ю. Бонитенко, А. Н. Гребенюк, В. А. Башарин, М. Б. Иванов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – № 3 (149). – С. 300-303.

47 Долго–Сабуров, В. Б. Центральные нейрхимические эффекты острого и хронического воздействия этанола. механизмы толерантности и зависимости (обзор литературы) / В. Б. Долго–Сабуров, А. Н. Петров, Д. С. Лисицкий [и др.] // Medline. – 2011. – Т. 12. – С. 1423-1436.

48 Бонитенко, Е. Ю. Токсичность и особенности метаболизма этанола, «суррогатов» алкоголя и спиртов, способных вызывать массовые отравления: Обоснование направлений фармакологической профилактики и терапии интоксикаций (клинико-экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 05.26.02, 14.00.20 / Бонитенко Евгений Юрьевич. – СПб., 2007. – 46 с.

49 Зиматкин, С. М. Окисление этанола в мозге / С.М. Зиматкин // Журнал ГрГМУ. – 2007. – №2. – С. 58-63.

50 Mann, K. Do women develop alcoholic brain damage more readily than men? / K. Mann, A. Vatra, A. Gunther [et al.] // Alcoholism : Clinical and Experimental Research. – 1992. – №16 (6). – P. 1052-1056.

51 Шабанов, П. Д. Биология алкоголизма / П. Д. Шабанов, С. Ю. Калишевич. – СПб.: Изд. «Лань», 1998. – 272 с.

52 Шангареева, З. А. Анализ полиморфизма генов, участвующих в метаболизме этанола у лиц с алкогольной болезнью печени / З. А. Шангареева, Т.

В. Викторова, Х. М. Насыров [и др.] // Медицинская генетика. – 2003. – Т. 2, № 11. – С. 485-490.

53 Agarwal, D. P. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes / D. P. Agarwal // *Pathol. Biol.* – 2001. – № 9 (49). – P. 703-709.

54 Tabakoff, B. Genetical genomic determinants of alcohol consumption in rats and humans / B. Tabakoff, L. Saba, M. Printz [et al.] // *BMC Biology.* – 2009. – № 7. – P. 70.

55 Tabakoff, B. The genomic determinants of alcohol preference in mice / B. Tabakoff, L. Saba, K. Kechris // *Mammalian Genome.* – 2008. – V. 19. – P. 352-365.

56 Ducci, F. Genetic approaches to addiction: genes and alcohol / F. Ducci, D. Goldman // *Addiction.* – 2008. – V. 103. – P. 1414-1428.

57 Nieratschker, V. Genetics and epigenetics of alcohol dependence / V. Nieratschker, A. Batra, A. J. Fallgatter // *Journal of Molecular Psychiatry.* – 2013. – №1. – P. 11.

58 Enoch, M. A. The genetics of alcoholism and alcohol abuse / M. A. Enoch, D. Goldman // *Curr. Psychiatr.* – 2001. – № 3. – P. 144-151.

59 Iyer-Eimerbrink, P. A. Genetics of alcoholism / P. A. Iyer-Eimerbrink, J. I. Nurnberger // *Curr. Psychiatry.* – 2014. – № 16 (12). – P. 518.

60 Vaughn, M. G. Gene-environment interplay and the importance of self-control in predicting polydrug use and substance-related problems / M. G. Vaughn, K. M. Beaver, M. DeLisi [et al.] // *Addictive Behaviors.* – 2009. – № 34. – P. 112-116.

61 Mayfield, R.D. Genetic factors influencing alcohol dependence / R. D. Mayfield, R. A. Harris, M. A. Schuckit // *British Journal of Pharmacology.* – 2008. – № 154 (2). – P. 275-287.

62 Goldman, D. The genetics of addictions: uncovering the genes / D. Goldman, G. Oroszi, F. Ducci // *Genetics.* – 2008. – V. 6. – P. 521-532.

63 Hall, W. D. The genetics of nicotine addiction liability: ethical and social policy implications / W. D. Hall, E. Coral, A. Carter // *Addiction* – 2008. – № 103 (3). – P. 350-359.

- 64 Li, M. D. New insights into the genetics of addiction / M. D. Li, M. Burmeister // *Nature Reviews Genetics*. – 2009. – № 10 (4). – P. 225-231.
- 65 Felderbauer, P. Multifactorial genesis of pancreatitis in primary hyperparathyroidism: evidence for "protective" (PRSS2) and "destructive" (CTRC) genetic factors/ P. Felderbauer, E. Karakas, V. Fendrich [et al.] // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. – 2011. – № 119 (1). – P. 26-9.
- 66 Yin, S. J. Functional polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases / S. J. Yin // *Alcohol in Health and Disease*. – 2001. – P. 1-26.
- 67 Elisabeth, A. T. Overview of the Genetics of Alcohol Use Disorder / A. T. Elisabeth, D. H. Samuel, W. L. Falk // *Alcohol and Alcoholism*. – 2016. – № 51 (5). – P. 507-514.
- 68 Crews, F. T. Cytokines and alcohol / F. T. Crews, R. Bechara, L. A. Brown [et al.] // *Alcohol. Clin. Exp.* – 2006. – № 30. – P. 720-730.
- 69 Edenberg, H. J. Genes contributing to the development of alcoholism : an overview / H. J. Edenberg // *Alcohol. Research*. – 2012. – № 34 (3). – P. 336-338.
- 70 Ахметов И. И. Молекулярная генетика спорта: монография / И. И. Ахметов. – М. : Сов. спорт, 2009. – 268 с.
- 71 Сергиенко, Л. П. Основы спортивной генетики: учеб. пособие для вузов / Л. П. Сергиенко. – К. : Вища шк., 2004. – 632 с.
- 72 Хлесткина, Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е. К. Хлесткина // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2013. – № 4/2 (17). – С. 1044-1054.
- 73 Алтухов, Ю. П. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике / Ю. П. Алтухов, Е. А. Салменкова // *Генетика*. – 2002. – Т. 38. – С. 1173–1195.
- 74 Väli, U. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations / Ü. Väli, M. Brandström, M. Johansson [et al.] // *BMC Genetics*. – 2008. – № 9. – P. 8.

75 Сулимова, Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г. Е. Сулимова // Усп. соврем. биологии. – 2004. – Т. 124. – С. 260-271.

76 Clifford, R. Expression-based genetic/physical maps of single nucleotide polymorphisms identified by the cancer genome anatomy project / R. Clifford, M. Edmonson, Y. Hu [et al.] // Genome Res. – 2000. – № 10. – P.1259-1265.

77 Altshuler, D. Genetic Mapping in Human Disease / D. Altshuler, M. J. Daly, E. S. Lander // Science V. – 2008. – № 322. – P. 881-8898.

78 Шангареева, З. А. Полиморфизм ДНК-локусов генов-кандидатов алкогольной болезни печени : дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.04 / Шангареева Зилия Асгатовна. – М., 2005. – 114 с.

79 Krawczak, M. Changes in primary DNA sequence complexity influence the phenotypic consequences of mutations in human gene regulatory regions / M. Krawczak, N. A. Chuzhanova, P. D. Stenson [et al.] // Hum Genet. – 2000. – V.107. – P. 362-365.

80 Монахов, М. В. Полиморфные маркеры генов, ассоциированные с психологическими признаками и риском развития психических расстройств : дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.03, 03.00.15 / Монахов Михаил Владимирович. – М., 2009. – 115 с.

81 Васильев, Г. В. Молекулярно-генетические эффекты единичных нуклеотидных замен в интроне 6 гена триптофандиоксигеназы человека и мыши : дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Васильев Геннадий Владимирович. – Н., 2003 – 120 с.

82 Солопёкин, Н. В. Исследование риска подверженности алкоголизму коренного населения юга Западной Сибири по данным молекулярно-генетических маркеров / Н. В. Солопёкин, М. Б. Лавряшина, М. В. Ульянова [и др.] // Вестник КемГУ. – 2013. – № 1. – С. 39-43.

83 Марусин, А. В. Полиморфизм генов алкогольдегидрогеназ ADH1B и ADH7 в русских популяциях сибирского региона / А. В. Марусин, В. А. Степанов,

М. Г. Спиридонова [и др.] // Молекулярная биология. – 2004. – № 4 (38). – С. 625-631.

84 Nagata, N. Assessment of a difference in ALDH2 heterozygotes and alcoholic liver injury / N. Nagata, M. Hiyoshi, H. Shiozawa [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2002. – V. 26 (8). – P. 11S-14S.

85 Li, D. Strong protective effect of the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH2) 504lys (*2) allele against alcoholism and alcohol-induced medical diseases in Asians / D. Li, H. Zhao, J. Gelernter // Hum Genet. – 2012. – № 131. – P. 725-737.

86 Edenberg, H. J. Variations in *GABRA2*, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations / H. J. Edenberg, D. M. Dick, X. Xuei [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 2004. – № 74. – P. 705-714.

87 Чоговадзе, А. Г. Ассоциация полиморфизмов генов ADH1B, ALDH2 и CYP2E1 с развитием алкогольной зависимости и алкогольного цирроза печени / А. Г. Чоговадзе, А. В. Генерозов, В. В. Николоева [и др.] // Наркология. – 2011. – № 1. – С. 50-56.

88 Мус, Л. В. Влияние дефицита катехол-О-метилтрансферазы на подкрепляющие эффекты кокаина (экспериментальное исследование) / Л. В. Мус, О. А. Драволина, А. Ю. Беспалов [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии имени С. С. Корсакова. – 2012. – № 7. – С. 48-52.

89 Бояркина, А. В. Влияние психологических и генетических факторов на эффективность послеоперационной аналгезии опиоидами : дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.20 / Бояркина Анна Викторовна. – С., 2014. – 137 с.

90 Stein, D. J. Warriors versus worriers: the role of COMT gene variants / D. J. Stein, T. K. Newman, J. Savitz [et al.] // CNS Spectr. – 2006. – №11 (10). – P.745-748.

91 Voisey, J. A. Novel SNP in COMT is associated with alcohol dependence but not opiate or nicotine dependence: a case control study / J. Voisey, H. D. Swagell, I. P. Hughes [et al.] // Behavioral and Brain Functions. – 2011. – № 7. – P. 51.

92 Иванц, Н. Н. Наркология: национальное руководство / Н. Н. Иванц, И. П. Анохина, М. А. Винникова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 720 с.

93 Васильев, Г. В. Молекулярно-генетические эффекты единичных нуклеотидных замен в интроне 6 гена триптофандиоксигеназы человека и мыши : автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Васильев Геннадий Владимирович. – Н., 2004. – 16 с.

94 Васильев, Г. В. Точковые мутации в районе 663-666 п.н. интрона 6 гена триптофаноксигеназы, связанные с рядом психических расстройств, разрушают сайт связывания фактора транскрипции YY1 / Г. В. Васильев, В. М. Меркулов, В. Ф. Кобзев [и др.] // Мол. Биология. – 2000. – № 34. – С. 214-222.

95 Doehring, A. Genetic variants altering dopamine D2 receptor expression or function modulate the risk of opiate addiction and the dosage requirements of methadone substitution / A. Doehring, N. Hentig, J. Graff [et al.] // Pharmacogenet. Genomics. – 2009. – № 19 (6). – P. 407-414.

96 Strien, T. Parental control and the dopamine D2 receptor gene (DRD2) interaction on emotional eating in adolescence / T. Strien, H. M. Snoek, C. S. van der Zwaluw [et al.] // Appetite. – 2010. – № 54 (2). – P. 255-61.

97 Wang, F. A. Large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence / F. Wang, A. Simen, A. Arias [et al.] // Hum. Genet. – 2013. – № 132 (3). – P. 347-358.

98 Ponce, G. The A1 allele of the DRD2 gene (TaqI A polymorphisms) is associated with antisocial personality in a sample of alcohol-dependent patients / G. Ponce, M. A. Jimenez-Arriero, G. Rubio [et al.] // Eur Psychiatry. – 2003. – № 18 (7). – P. 356-360.

99 Черепкова, Е. В. Патогенетическое значение полиморфизма генов нейромедиаторной системы, ассоциированных с формированием личностных расстройств и с употреблением психоактивных веществ : дисс. ... докт. мед. наук : 14.03.03 / Черепкова Елена Владимировна. – Б., 2011. – 265 с.

100 Кибитов, А. О. Сочетание полиморфизма генов DAT и DBH с семейной отягощенностью по алкогольной зависимости увеличивает риск развития судорожных приступов и алкогольных психозов у мужчин / А. О. Кибитов, Д. В. Иващенко, В. М. Бродянский [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2016. № 12. – С. 68-80.

101 Köhnke, M. D. Association of the dopamine transporter gene with alcoholism / M. D Köhnke, A. Batra, W. Kolb [et al.] // Alcohol/ Alcohol. – 2005. – № 40 (5). – P. 339-342.

102 Голухова, Е. З. Фармакогенетические основы, определяющие нежелательные лекарственные реакции у кардиохирургических больных, принимающих варфарин / Е. З. Голухова, С. М. Арсланбекова, Д. А. Сычев // Креативная кардиология. – 2011. – № 1. – С. 20-27.

103 Carlquist, J. F. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study / J. F. Carlquist, B. D. Horne, J. B. Muhlestein [et al.] // J. Thromb. Thrombolysis. – 2006. – № 3 (22). – P. 191-197.

104 Lu, Y. Prediction of warfarin maintenance dose in han chinese patients using a mechanistic model based on genetic and non-genetic factors / Y. Lu, J. Yang, H. Zhang [et al.] // Clin. Pharmacokinet. – 2013. – № 7 (52). – P. 567-581.

105 Зотова, И. В. Влияние полиморфизма генов CYP2C9 и VKORC1 на безопасность терапии варфарином / И. В. Зотова, А. Г. Никитин, Э. Н. Фаттахова // Клиническая практика. – 2013. – № 4 (16). – С.3-10.

106 Тиходеев, О. Н. Основы психогенетики / О. Н. Тиходеев – М. : "Академия", 2011. – 320 с.

107 Хальчицкий, С. Е. Молекулярно-генетические аспекты предрасположенности к возникновению и развитию наркотической зависимости / С. Е. Хальчицкий / Адаптивная физическая культура. – 2007. – № 3 (31). – С. 6-15.

108 Свечникова, Н. Н. Ассоциированность вариантов течения атопического дерматита с соматотипами, дисплазиями соединительной ткани,

морфофункциональными особенностями слизистых оболочек желудка и дистальных отделов толстой кишки : дисс. ... докт. мед. наук: 14.00.11 / Свечникова Наталья Николаевна. – Н., 2003. – 283 с.

109 Куличкин, С. С. Молекулярно-генетическое изучение наследственной предрасположенности к развитию хронического алкоголизма в популяциях якутов и эвенков Республики Саха (Якутия) : дисс. ... канд. биол. наук : 03.00.15 / Куличкин Степан Степанович.- У., 2009. – 229 с.

110 Хуснутдинова, Э. К. Этногеномика / Э. К. Хуснутдинова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – № 17 (4/2). – С. 943-956.

111 Cinnioglu, S. Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia / S. Cinnioglu, R. King, T. Kivisild // Human Genetics. – 2004. – № 114. – P. 127-148.

112 Жейкова, Т. В. Генетическая основа регуляции окислительного стресса : связь с продолжительностью жизни и ишемической болезнью сердца : дисс. ... канд. мед. наук: 03.02.07 / Жейкова Татьяна Владимировна. – Т., 2013. – 147 с.

113 Chinnery, P. F. Mitochondrial DNA Haplogroups and Type 2 Diabetes : a Study of 897 Cases and 1010 Controls / P. F. Chinnery, C. Mowbray, S. K. Patel [et al.] // Journal of Medical Genetics. – 2007. – № 44.6. – P. 80.

114 Трифонова, Е. А. Структура неравновесия по сцеплению гена MTHFR в популяциях Северной Евразии и у больных коронарным атеросклерозом: дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.15 / Трифонова Екатерина Александровна. – Т., 2009. – 145 с.

115 Минеев, В. Н. Полиморфизм гена белка STAT6 и бронхиальная астма / В. Н. Минеев, Л. Н. Сорокина, М. А. Нема // Казанский медицинский журнал. – 2009. – № 90 (1). – С. 102-109.

116 Butler, M. G. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review / M. G Butler // J. Assist. Reprod. Genet. – 2009. – № 26. – P. 477-486.

117 Ванюшин, Б. В. Эпигенетика сегодня и завтра / Б. В. Ванюшин // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – № 17 (4/2). – С. 805-832.

118 Bird, A. Perceptions of epigenetics / A. Bird // *Nature*. – 2007. – № 447 (7143). – P. 396-398.

119 Наумов, А. В. Роль процессов метилирования в этиологии и патогенезе шизофрении / А. В. Наумов, Ю. Е. Разводовский // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2009. – № 8. – С. 91-98.

120 Portela, A. Epigenetic modifications and human disease / A. Portela, M. Esteller // *Nat. Biotechnol.* – 2010. – № 28. – С. 1057-1068.

121 Jurkowska, R. Z. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases / R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch // *Chembiochem.* – 2011. – №12. – P. 206-222.

122 Гвоздев, В. А. Регуляция активности генов, обусловленная химической модификацией (метилированием) ДНК / В. А. Гвоздев // *Соровский образовательный журнал*. – 1999. – № 10. – С. 11-17.

123 Bleich, S. Homocysteine and alcoholism / S. Bleich, D. Degner, K. Javaheripour // *J. Neural. Transm. Suppl.* – 2000. – № 60. – P. 187-196.

124 Bleich, S. Elevated homocysteine levels in alcohol withdrawal / S. Bleich, D. Degner, J. Wiltfang // *Alcohol Alcohol.* – 2000. – № 35. – P. 351-354.

125 Nieratschker, V. Genetics and epigenetics of alcohol dependence / V. Nieratschker, A. Batra, A. J. Fallgatter [et al.] // *Journal of Molecular Psychiatry.* – 2013. – № 1. – P. 11.

126 Bonsch, D. Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism / D. Bonsch, B. Lenz, U. Reulbach [et al.] // *J. Neural. Transm.* – 2004. – № 11. – P. 1611-1616.

127 Bonsch, D. Lowered DNA methyltransferase (DNMT-3b) mRNA expression is associated with genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism / D. Bonsch, B. Lenz, R. Fiszer [et al.] // *J. Neural. Transm.* – 2006. – №113. – P. 1299-1304.

128 Biermann, T. N-methyl-D-aspartate 2b receptor subtype (NR2B) promoter methylation in patients during alcohol withdrawal / T. Biermann, U. Reulbach, B. Lenz [et al.] // J. Neural. Transm. – 2009. – № 116. – P. 615-622.

129 Hillemacher, T. Epigenetic regulation and gene expression of vasopressin and atrial natriuretic peptide in alcohol withdrawal / T. Hillemacher, H. Frieling, K. Luber [et al.] // Psychoneuroendocrinology. – 2009. – № 34. – P. 555-560.

130 Zhang, H. Hypermethylation of OPRM1 promoter region in European Americans with alcohol dependence / H. Zhang, A.I. Herman, H.R. Kranzler [et al.] // J. Hum. Genet. – 2012. – № 57. – C. 670-675.

131 Bleich, S. Epigenetic DNA hypermethylation of the HERP gene promoter induces down-regulation of its mRNA expression in patients with alcohol dependence / S. Bleich, B. Lenz, M. Ziegenbein [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2006. – № 30. – P. 587-591.

132 Hillemacher, T. Promoter specific methylation of the dopamine transporter gene is altered in alcohol dependence and associated with craving / T. Hillemacher, H. Frieling, T. Hartl [et al.] // J. Psychiatr. Res. – 2009. – № 43. – P. 388-392.

133 Bonsch, D. DNA hypermethylation of the alpha synuclein promoter in patients with alcoholism / D. Bonsch, B. Lenz, J. Kornhuber [et al.] // Neuroreport. – 2005. – № 16. – P. 167-170.

134 Taqi, M. M. Prodynorphin CpG-SNPs associated with alcohol dependence: elevated methylation in the brain of human alcoholics / M. M. Taqi, I. Bazov, H. Watanabe [et al.] // Addict/ Biol. – 2011. – № 16. – P. 499-509.

135 Muschler, M. A. DNA methylation of the POMC gene promoter is associated with craving in alcohol dependence / M. A. Muschler, T. Hillemacher, C. Kraus [et al.] // J. Neural. Transm. – 2010. – № 17. – P. 513-519.

136 Эллис, С. Д. Эпигенетика / С.Д. Эллис, Т. Дженювейн, Д. Рейнберг. – М. : Техносфера, 2010. – 496 с.

137 Lee, Y. Histone H3 phosphorylation at serine 10 and serine 28 is mediated by p38 MAPK in rat hepatocytes exposed to ethanol and acetaldehyde / Y. Lee, S. D. Shukla // *European Journal of Pharmacology*. – 2007. – № 573 (1-3). – P. 29-38.

138 James, T. T. Histone H3 phosphorylation (Ser10, Ser28) and phosphoacetylation (K9S10) are differentially associated with gene expression in liver of rats treated in vivo with acute ethanol / T. T. James, A. R. Aroor, Lim [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2012. – № 340 (2). – P. 237-247.

139 Shivendra, D. Epigenetic Effects of Ethanol on the Liver and Gastrointestinal System / D. Shivendra, Shukla, R. W. Lim [et al.] // *Alcohol Research: Current Reviews*. – 2013. – № 35 (1). – P. 47-55.

140 Perry, G. H. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation / G. H. Perry, N. J. Dominy, K. G. Claw [et al.] // *Nature Genetics*. – 2007. – № 39. – P. 1256-1260.

141 Qu, Y. J. Association of Copy Numbers of Survival Motor Neuron Gene 2 and Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Gene With the Natural History in a Chinese Spinal Muscular Atrophy Cohort / Y. J. Qu, X. S. Ge, J. L. Bai [et al.] // *J. Child. Neurol.* – 2015. – № 30 (4). – P. 429-436.

142 Falchi, M. Low copy number of the salivary amylase gene predisposes to obesity / M. Falchi, J. S. El-Sayed Moustafa, P. Takousis // *Nature Genetics*. – 2014. – № 46. – P. 492-497.

143 Патрушев, Л. И. Экспрессия генов / Патрушев, Л. И. – М. : Наука, 2000. – 830 с.

144 Мисюрин, В. А. Исследование особенностей экспрессии и распространённости раково-тестикулярных генов : дисс. ... канд. биол. наук: 14.01.12 / Мисюрин Всеволод Андреевич. – М., 2014. – 119 с.

145 Gandhi S. J. Transcription of functionally related constitutive genes is not coordinated / S. J Gandhi, D. Zenklusen, T. Lionnet [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2011. – №18 (1). – P. 27-34.

146 Минаева, Е. С. Выбор референс-гена для количественного анализа генной экспрессии в процессе гаметогенеза одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas Reinhardtii* / Е. С. Минаева, Ж. М. Залуцкая, А. В. Аникина // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2011. – № 4. – С. 99-106.

147 Weake, V. M. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms / V. M Weake, J. Workman // Mucmillan Publishe. – 2010. – V. 11. – P. 426-437.

148 Гармаш, И. В. Генетика и алкогольный цирроз печени / И. В. Гармаш, О.С. Аришева // Клиническая гепатология. – 2013. – № 1. – С. 14-18.

149 Виноградова, С. В. Роль генетических факторов в развитии алкогольной болезни печени / Виноградова С. В. // Современные проблемы токсикологии. – 2007. – № 2. – С. 27-37.

150 Марри, Р. Биохимия человека. В 2-х томах / Р. Марри, Д. Греннер [и др.]. – Пер. с англ. – М.: Мир, 1993; Т1 – 384 с.; Т2 – 415 с.

151 Strachan, T. Human Molecular Genetics. 2nd edition / T. Strachan, A. P. Read. – New York : Wiley-Liss, 1999. – 576 p.

152 Nomura, F. Transcriptional activity of the tandem repeat polymorphism in the 5' flanking region of the human CYP2E1 gene / F. Nomura, S. Itoga, T. Uchimoto [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2003. – V. 27 (8). – P. 42S-46S.

153 Danko, I. M. Association of CYP2E1 gene polymorphism with predisposition to cancer development / I. M. Danko, N. A. Chaschin // Exp. Oncol. – 2005. – P. 248-256.

154 Pirmohamed, M. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians / M. Pirmohamed, N. R. Kitteringham, L. J. Quest [et al.] // Pharmacogenetics. – 1995. – V. 5. – P. 351-357.

155 Latchman, D. S. Transcription factors: an overview / D.S. Latchman // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 1997. – № 29 (12). – P. 1305-1312.

156 Кибитов, А. О. Структурные и функциональные особенности гена тирозингидроксилазы и врожденная предрасположенность к алкогольной

зависимости : дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.45 / Кибитов Александр Олегович. – М., 2004. – 165 с.

157 Гилберт, С. Биология развития: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ. / С. Гилберт. – М. : Мир, 1994. – 235 с.

158 Садовникова, В. В. Методические указания по молекулярной генетике / В. В. Садовникова, Н. А. Бобылева, Н.Н. Иванова. – Н. Н. : Изд-во НГМА, 1999. – 32 с.

159 Song, B. J. Post-translational modifications of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and biomedical implications / B. J. Song, M. A. Abdelmegeed, S. H. Yoo // J. Proteomics. – 2011. – № 74 (12). – С. 2691-2702.

160 Венцак, Е. В. Алкогольная болезнь печени и роль генетических факторов в ее развитии / Е. В. Венцак, Н. М. Козлова // Сибирский медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 8-14.

161 Кашуро, В. А. Динамика содержания нейротрофических факторов головного мозга при экспериментальной коме / В. А. Кашуро, Е. Г. Батоцыренова, Н. Л. Елаева [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2013. – № 5. – С. 695-699.

162 Liyins, Y. Death pathway activated in the neurotrophic factor – deprived neurons / Y. Liyins // Doctoral dissertation (article-based), University of Helsinki. – 2009. – 71 p.

163 Семенов, В. А. Поражение нервной системы при воздействии химических и физических факторов: Учебное пособие для студентов лечебного факультета медицинских вузов / В. А. Семенов, О. А. Громова, А. В. Субботин. – М., 2009. – 246 с.

164 Тюренков, И. Н. ГАМК_A-рецепторы, структура и функции / И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – № 73 (10). – С. 43-48.

165 Faingold, C. GABA and increased glutamate receptor-mediated activity on inferior colliculus neurons in vitro are associated with susceptibility to ethanol

withdrawal seizures / C. Faingold, Y. Li, M.S. Evans // *Brain Res.* – 2000. – № 868 (2). – P. 287-295.

166 Devaud, L. L. Ethanol dependence has limited effects on GABA or glutamate transporters in rat brain / L. L. Devaud // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2001. – № 25 (4). – P. 606-611.

167 Семьянов, А. В. Нейрон-глиальное взаимодействие в мозге. Учебно-методический материал по программе повышения квалификации «Хранение и обработка информации в биологических системах» / А. В. Семьянов. – Н.Н., 2007. – 107 с.

168 Кашуро, В. А. Некоторые механизмы нарушения биоэнергетики и оптимизация подходов к их фармакотерапии / В. А. Кашуро, В. Б. Долго-Сабуров, В. А. Башарин // *Medline.ru.* – 2010. – № 2-2 (11). – С. 611-634.

169 Семьянов, А. В. Гамк-эргическое торможение в цнс: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического гамк-опосредованного тормозного действия / А. В. Семьянов // *Нейрофизиология.* – 2002. – № 34 (1). – С. 82-92.

170 Fabian, C. R. GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy / C. R. Fabian, A. Draguhn // *Neural. Plasticit.* – 2012. – 12 p.

171 Перфилова, В. Н. Кардиопротекторные свойства структурных аналогов ГАМК : дисс. ... докт. биол. наук: 14.00.25 / Перфилова Валентина Николаевна. – В., 2009. – 304 с.

172 Graham, A. R. GABAA Receptor channel pharmacology / A. R. Graham // *Current Pharmaceutical Design.* – 2005. – V. 11. – P. 1867-1885.

173 Boehm, S. L. Deletion of the fyn-kinase gene alters sensitivity to GABAergic drugs: dependence on beta2/beta3 GABAA receptor subunits / S. L. Boehm, L. Peden, R. A. Harris [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. – № 309 (3). – P. 154-1159.

174 Kumar, S. The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: A decade of progress / S. Kumar, P. Porcu, D. F. Werner [et al.] // *Psychopharmacology.* – 2009. – № 205 (4). – P. 529-564.

175 Breese, G. R. Basis of the gaba mimetic profile of ethanol / G. R Breese, H. E Criswell, M. Carta // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2006. – № 30 (4). – P. 731-744.

176 Borghese, C. M. Alcohol Dependence and Genes Encoding $\alpha 2$ and $\gamma 1$ GABA_A Receptor Subunits / C. M. Borghese, R. A. Harris // Alcohol Research:Current Reviews – 2012. – № 34 (3). – P. 345- 354.

177 Whiting, P. J. GABA receptors A review of GABA and the receptors to which it binds GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? / P. J. Whiting // Drug. Discov. Today. – 2003. – № 8 (10). – P. 445-450.

178 Бонитенко, Е. Ю. Алгоритм экспериментального моделирования токсической комы у крыс / Е. Ю. Бонитенко, А. И. Головко, В. А. Башарин // Medline.ru. – 2010. – Т. 11 (ст. 59). – С. 718-735.

179 Нил, М. Дж. Наглядная фармакология для вузов / М. Дж. Нил. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 156 с.

180 Nuss, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation / P. Nuss // Neuropsychiatr. Dis. Treat. – 2015. – №11. – P. 165-175.

181 Головко, А. И. Механизмы фармакологической активности антидепримирующих средств, действующих на системы ГАМК и глутаминовой кислоты / А. И. Головко, В. А. Баринов // Medline. – 2012. – № 13. – С. 157-184.

182 Wallner, M. Ethanol enhances $\alpha 4\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ γ -aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans / M. Wallner, H. J. Hanchar, R. W. Olsen // PNAS. – 2003. – № 100 (35). – P. 15218-15223.

183 Herd, M. B. Neurosteroid modulation of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors / M. B. Herd, D. Belelli, J. J. Lambert // Pharmacol. Ther. – 2007. – № 116 (1). – P. 20-34.

184 Lind, P. A. Effects of GABRA2 variation on physiological, psychomotor and subjective responses in the alcohol challenge twin study / P. A. Lind, S. MacGregor, G. W. Montgomery // Twin. Res. Hum. Genet. – 2008. – № 11 (2). – P. 174-182.

185 Gozzi, A. Reduced limbic metabolism and fronto-cortical volume in rats vulnerable to alcohol addiction / A. Gozzi, F. Agosta, M. Massi // *Neuroimage*. – 2013. – № 69. – P. 112-119.

186 Dick, D. M. The genetics of alcohol and other drug dependence / D. M. Dick, A. Agrawal // *Alcohol. Res. Health*. – 2008. – № 31 (2). – P. 111-118.

187 Dick, D. M. Association of GABRG3 with alcohol dependence / D. M. Dick, H. J. Edenberg, X. Xuei // *Alcoholism. Clinical and Experimental Research*. – 2004. – № 28. – P. 4-9.

188 D'Addario, C. Linkage disequilibrium, haplotype and association studies of a chromosome 4 GABA receptor gene cluster: Candidate gene variants for addictions / C. D'Addario, G. R. Uhl // *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*. – 2006. – № 141B. – P. 854-860.

189 Orser, B. A. Extrasynaptic GABAA receptors are critical targets for sedative-hypnotic drugs / B. A. Orser // *Journal of Clinical Sleep Medicine*. – 2006. – № 2. – P. S12-S8.

190 Pierucci-Lagha, A. GABRA2 alleles moderate the subjective effects of alcohol, which are attenuated by finasteride / A. Pierucci-Lagha, J. Covault, R. Feinn [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2005. – № 30 (6). – P. 1193-1203.

191 Wu, C. H. Differential expression of GABAA/benzodiazepine receptor subunit mRNAs and ligand binding sites in mouse cerebellar neurons following in vivo ethanol administration: an autoradiographic analysis / C. H. Wu, A. Frosthalm, A. L. De Blas [et al.] // *Neurochem*. – 1995. – № 65 (3). – P. 1229-1239.

192 Pignataro, L. The regulation of neuronal gene expression by alcohol / L. Pignataro, P. Lindsay, E. Tannenholz [et al.] // *Pharmacol. Ther*. – 2003. – № 124 (3). – P. 324-335.

193 Шаронова, И. Н. Электрофизиологическое исследование механизмов действия эндогенных и экзогенных модуляторов ионотропных рецепторов в нейронах головного мозга : дисс. ... докт. биол. наук: 03.03.06 / Шаронова Ирина Николаевна. – М., 2014. – 327 с.

194 Anstee, Q. M. Mutations in the Gabrb1 gene promote alcohol consumption through increased tonic inhibition / Q. M. Anstee, S. Knapp, E. P. Maguire // *Nat. Commun.* – 2013. – № 4. – P. 2816.

195 Западнюк, И. П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте: Учебное пособие для биол. спец. вузов – 3-е изд., перераб. и доп. / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Западнюк [и др.]. – К. : Вища школа, 1983. – 383 с.

196 Прозоровский, В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований / В. Б. Прозоровский // *Психофармакология и биологическая наркология.* – 2007. – № 3-4 (7). – С. 2090-2120.

197 Прозоровский, В. Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентраций биологически активных веществ / В. Б. Прозоровский. – Б. : Институт экологической токсикологии, 1994. – 46 с.

198 Гацура, В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура. – М.: Медицина, 1974. – 48 с.

199 Петров, А. Н. Методические указания по оценке лечебной эффективности новых лекарственных средств на экспериментальных моделях алкогольных гепатитов различной степени тяжести / А.Н. Петров. – М., 2013. – 27 с.

200 Веницкая, А. Г. Сравнительная характеристика обмена гаммааминомасляной кислоты в головном мозге и печени крыс при синдроме отмены этанола / А. Г. Веницкая // *Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук.* – 2009. – № 3. – С. 27-30/

201 Enoch, M. A. GABAergic gene expression in postmortem hippocampus from alcoholics and cocaine addicts; corresponding findings in alcohol-naïve P and NP rats / M. A. Enoch, Z. Zhou, M. Kimura [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – №7 (1). – P. e29369.

202 Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

203 Calculatrs for odds ratio [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://medstatistic.ru/calculators/calcodds.html> (accessed 12 February 2019).

204 Лисицкий, Д. С. Экспериментальное исследование динамики восстановления нарушенных функций ЦНС при тяжёлой форме острого отравления этанолом интактных и предварительно алкоголизированных крыс // Вестник Южно-Казахской государственной фармацевтической академии. – 2014. – № 1. – С. 36-38.

205 Антонцева, Е. В. Поиск регуляторных SNPs, связанных с развитием рака толстой кишки, в генах APC и MLH1 / Е. В. Антонцева, Л. О. Брызгалов, М. Ю. Матвеева [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – № 4 (15). – С.644-652.

206 Duan, J. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor / J. Duan, M. S. Wainwright, J. M. Comeron [et al.] // Hum. Mol. Genet. – №12. – P. 205-216.

207 Семенова, В. Г. Потери населения России в 2000-2008 гг., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции [Электронный ресурс] / В. Г. Семенова, О. И. Антонова, Г. Н. Евдокушкина [и др.] // Социальные аспекты здоровья населения: электронный научный журнал – 2010. – Режим доступа: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/188/27/>.

208 Warden, A. S. Gene expression profiling in the human alcoholic brain // A. S. Warden, R. D. Mayfield // Neuropharmacology. – 2017. – № 122. – P.161-174.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 1 – Распределение частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в соответствии с тяжестью угнетения функционирования ЦНС крыс спустя 3 часа после воздействия этанолом

№	Ген/ Полиморфизм	Генотип	Абсолютные частоты генотипов (относительные частоты генотипов, %)						p	
			физиологическая норма	оглушение	сопор	умеренная кома	глубокая кома	терминальная кома		летальный исход
1	<i>Gabra1</i> rs107127945 (n=100)	GG	0 (0)	0 (0)	10 (90,9)	62 (79,5)	7 (87,5)	0 (0)	1 (33,3)	0,246
		GT	0 (0)	0 (0)	1 (9,1)	15 (19,2)	1 (12,5)	0 (0)	2 (66,7)	
		TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
2	<i>Gabra1</i> rs197587817 (n=98)	TT	0 (0)	0 (0)	9 (81,8)	56 (73,8)	7 (87,5)	0 (0)	1 (33,3)	0,594
		CT	0 (0)	0 (0)	2 (18,2)	19 (25)	1 (12,5)	0 (0)	2 (66,7)	
		CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,32)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
3	<i>Gabra2</i> rs105733011 (n=98)	CC	0 (0)	0 (0)	7 (70,0)	63 (80,8)	7 (100)	0 (0)	3 (100)	0,366
		CT	0 (0)	0 (0)	3 (30,0)	15 (19,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

10	<i>Gabra3</i> rs105096249 (n=100)	TT	0 (0)	0 (0)	11 (100)	65 (83,3)	5 (62,5)	0 (0)	3 (100)	0,476
		AT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (16,7)	3 (37,5)	0 (0)	0 (0)	
11	<i>Gabra4</i> rs197596713 (n=94)	TT	0 (0)	0 (0)	6 (60)	50 (67,6)	6 (85,7)	0 (0)	3 (100)	0,336
		GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		GT	0 (0)	0 (0)	4 (40)	21 (28,4)	1 (14,3)	0 (0)	0 (0)	

Примечание:

N-количество животных;

p – статистическая значимость отличий;

*Статистически достоверные различия между группами

Таблица 2 – Распределение частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в соответствии с тяжестью угнетения функционирования ЦНС крыс спустя 8 часов после воздействия этанолом

№	Ген/ Полиморфизм	Генотип	Абсолютные частоты генотипов (относительные частоты генотипов, %)							p
			Экспертная оценка, баллов							
			физиологическая норма	оглушение	сопор	умеренная кома	глубокая кома	терминальная кома	летальный исход	
1	<i>Gabra1</i> rs107127945 (n=100)	GG	28 (73,7)	37 (86,0)	9 (81,8)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0,714
		GT	9 (23,7)	6 (14,0)	2 (18,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	
		TT	1 (2,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
2	<i>Gabra1</i> rs197587817 (n=98)	TT	24 (64,8)	34 (81,0)	9 (81,8)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0,789
		CT	12 (32,4)	8 (19,0)	2 (18,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	
		CC	1 (2,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
3	<i>Gabra2</i> rs105733011 (n=98)	CC	30 (81,0)	38 (90,5)	7 (63,6)	1 (50,0)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0,178
		CT	7 (19,0)	4 (9,5)	4 (36,4)	1 (50,0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	
4	<i>Gabra2</i> rs8168342 (n=86)	GG	29 (82,9)	31 (88,6)	8 (80,0)	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	3 (60,0)	0,166
		AG	6 (17,1)	4 (11,4)	2 (20,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40,0)	

5	<i>Gabra2</i> rs198286814 (n=100)	AA	31 (81,6)	39 (90,7)	8 (72,7)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	4 (66,6)	0,226
		AG	7 (18,4)	4 (9,3)	3 (27,3)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	
6	<i>Gabra2</i> rs198837638 (n=99)	GG	32 (84,2)	40 (93,0)	8 (72,7)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (60,0)	0,126
		AG	6 (15,8)	3 (7,0)	3 (27,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (40,0)	
7	<i>Gabrb1</i> rs13456854 (n=99)	TT	35 (94,6)	35 (81,4)	9 (81,8)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0,825
		CT	2 (5,4)	7 (16,3)	2 (18,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		CC	0 (0)	1 (2,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
8	<i>Gabrb1</i> rs13456852 (n=99)	CC	35 (94,6)	36 (83,7)	9 (81,8)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0,793
		CT	2 (5,4)	6 (14,0)	2 (18,2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		TT	0 (0)	1 (2,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
9	<i>Gabrb1</i> rs13456851 (n=99)	TT	36 (94,7)	34 (80,9)	8 (72,7)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0,659
		CT	2 (5,3)	8 (19,1)	3 (27,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
10	<i>Gabra3</i> rs105096249 (n=100)	TT	33 (86,8)	35 (81,4)	10 (90,9)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	5 (83,3)	0,869
		AT	5 (13,2)	8 (18,6)	1 (9,1)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	

11	<i>Gabra4</i> rs197596713 (n=94)	TT	24 (70,6)	29 (70,7)	7 (63,6)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	4 (66,7)	0,989
		GG	0 (0)	2 (4,9)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
		GT	10 (29,4)	10 (24,4)	3 (27,3)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	

Примечание:

N-количество животных;

p – статистическая значимость отличий;

*Статистически достоверные различия между группами

Таблица 3 – Распределение частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в соответствии с тяжестью угнетения функционирования ЦНС предварительно алкоголизованных крыс спустя 3 часа после воздействия этанолом

№	Ген/ Полиморфизм	Генотип	Абсолютные частоты генотипов (относительные частоты генотипов, %)							p
			Экспертная оценка, баллов							
			физиологическая норма	отглушение	сопор	умеренная кома	глубокая кома	терминальная кома	летальный исход	
1	<i>Gabra1</i> rs107127945 (n=55)	GG	0 (0)	2 (100)	0 (0)	6 (100)	20 (86,9)	4 (100)	17 (89,5)	0,083
		GT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (13,1)	0 (0)	2 (10,5)	
2	<i>Gabra1</i> rs197587817 (n=55)	TT	0 (0)	2 (100)	0 (0)	6 (100)	20 (86,9)	4 (100)	16 (84,2)	0,306
		CT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (13,1)	0 (0)	2 (10,5)	
		CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5,3)	
3	<i>Gabra2</i> rs105733011 (n=55)	CC	1 (100)	2 (100)	0 (0)	4 (66,7)	18 (78,3)	4 (100)	14 (73,7)	0,754
		CT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	5 (21,7)	0 (0)	5 (26,3)	
4	<i>Gabra2</i> rs8168342 (n=55)	GG	1 (100)	2 (100)	0 (0)	4 (66,7)	19 (82,6)	4 (100)	15 (78,9)	0,761
		AG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	4 (17,4)	0 (0)	4 (21,1)	
5	<i>Gabra2</i> rs198286814 (n=55)	AA	1 (100)	2 (100)	0 (0)	4 (66,7)	19 (82,6)	4 (100)	15 (78,9)	0,761
		AG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	4 (17,4)	0 (0)	4 (21,1)	
6	<i>Gabra2</i> rs198837638	GG	1 (100)	2 (100)	0 (0)	4 (66,7)	19 (82,6)	4 (100)	15 (78,9)	0,761

	(n=55)	AG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	4 (17,4)	0 (0)	4 (21,1)	
7	<i>Gabrb1</i> rs13456854 (n=55)	TT	0 (0)	2 (100)	0 (0)	3 (50)	22 (95,6)	2 (50)	18 (94,7)	0,001
		CT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	1 (4,4)	2 (50)	1 (5,3)	
8	<i>Gabrb1</i> rs13456852 (n=55)	CC	0 (0)	2 (100)	0 (0)	3 (50)	22 (95,6)	2 (50)	18 (94,7)	0,001
		CT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	1 (4,4)	2 (50)	1 (5,3)	
9	<i>Gabrb1</i> rs13456851 (n=55)	TT	0 (0)	2 (100)	0 (0)	3 (50)	22 (95,6)	2 (50)	18 (94,7)	0,001
		CT	1 (100)	0 (0)	0 (0)	3 (50)	1 (4,4)	2 (50)	1 (5,3)	
10	<i>Gabra3</i> rs105096249 (n=55)	TT	1 (100)	2 (100)	0 (0)	6 (100)	19 (82,6)	4 (100)	12 (63,2)	0,242
		AT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (17,4)	0 (0)	7 (36,8)	
11	<i>Gabra4</i> rs197596713 (n=55)	TT	0 (0)	2 (66,7)	0 (0)	2 (33,3)	18 (78,3)	2 (50)	13 (68,4)	0,282
		GT	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	3 (50,0)	3 (13,0)	2 (50)	6 (31,6)	
		GG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	2 (8,7)	0 (0)	0 (0)	

Примечание:

N-количество животных;

p – статистическая значимость отличий;

*Статистически достоверные различия между группами

Таблица 4 – Распределение частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* в соответствии с тяжестью угнетения функционирования ЦНС предварительно алкоголизированных крыс спустя 8 часов после воздействия этанолом

№	Ген/ Полиморфизм	Генотип	Абсолютные частоты генотипов (относительные частоты генотипов, %)							p
			Экспертная оценка, баллов							
			физиологическая норма	оглушение	сопор	умеренная кома	глубокая кома	терминальная кома	летальный исход	
1	<i>Gabra1</i> rs107127945 (n=55)	GG	2 (66,7)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	5 (83,3)	2 (100)	38 (90,4)	0,675
		GT	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	4 (9,6)	
2	<i>Gabra1</i> rs197587817 (n=55)	TT	2 (66,7)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	5 (83,3)	2 (100)	37 (88,0)	0,955
		CT	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	4 (9,6)	
		CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2,4)	
3	<i>Gabra2</i> rs105733011 (n=55)	CC	3 (100)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	2 (100,0)	34 (81,0)	0,257
		CT	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	0 (0)	8 (19,0)	
4	<i>Gabra2</i> rs8168342	GG	3 (100,0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	2 (100,0)	36 (85,7)	0,136

	(n=55)	AG	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	0 (0)	6 (14,3)	
5	<i>Gabra2</i> rs198286814 (n=55)	AA	3 (100,0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	2 (100,0)	36 (85,7)	0,136
		AG	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	0 (0)	6 (14,3)	
6	<i>Gabra2</i> rs198837638 (n=55)	GG	3 (100,0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	2 (100,0)	36 (85,7)	0,136
		AG	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	0 (0)	6 (14,3)	
7	<i>Gabrb1</i> rs13456854 (n=55)	TT	2 (66,7)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	5 (83,3)	2 (100,0)	37 (88,1)	0,482
		CT	1 (33,3)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	5 (11,9)	
8	<i>Gabrb1</i> rs13456852 (n=55)	CC	2 (66,7)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	5 (83,3)	2 (100,0)	37 (88,1)	0,482
		CT	1 (33,3)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	5 (11,9)	
9	<i>Gabrb1</i> rs13456851 (n=55)	TT	2 (66,7)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	5 (83,3)	2 (100,0)	37 (88,1)	0,482
		CT	1 (33,3)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	5 (11,9)	
10	<i>Gabra3</i> rs105096249 (n=55)	TT	3 (100)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	4 (66,7)	2 (100,0)	34 (81,0)	0,546
		AT	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	8 (19,0)	

11	<i>Gabra4</i> rs197596713 (n=55)	TT	2 (66,7)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	3 (50,0)	2 (100)	29 (69,0)	0,008
		GT	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	13 (31,0)	
		GG	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	0 (0)	
Примечание: N-количество животных; p – статистическая значимость отличий; *Статистически достоверные различия между группами										