

ОТЗЫВ

официального оппонента

д.б.н., профессора Сычевой Людмилы Петровны на диссертационную работу Осечкиной Натальи Сергеевны «**Прогнозирование тяжести интоксикации этанолом на основе генетических маркеров ГАМК_A-рецептора**», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – Токсикология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования. Работа Н.С. Осечкиной посвящена актуальной проблеме – исследованию одного из аспектов индивидуальной чувствительности к алкоголю и поиск молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с разной степенью интоксикации. Проблема алкоголизма имеет глубокие корни, тем не менее эта проблема остро стоит и в настоящее время. Алкогольные отравления занимают ведущее место среди бытовых отравлений в нашей стране, более 60% всех смертельных отравлений обусловлено этой патологией. Значительное ухудшение клинических проявлений поражения мозга и высокая летальность ставят перед исследователями необходимость разработки новых методов диагностики и прогнозирования степени воздействия алкоголя на организм.

В настоящее время наиболее изученными являются биохимические маркеры алкоголизма. Однако точные механизмы зависимости степени тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему от наследственных особенностей организма пока остаются малоизученными. Работа Н.С.Осечкиной сконцентрирована на исследовании приоритетных структур организма, поражение которых приводит к депримирующему действию фактора, а именно на изучении полиморфных вариантов и экспрессии ряда генов ГАМК-ергической системы с использованием самых современных на сегодняшний день молекулярно-генетических методов.

Значимость и актуальность данной работы определяется тем, что исследование направлено на поиск новых закономерностей в патогенезе алкоголизма, молекулярно-генетических маркеров прогнозирования тяжести течения интоксикации этанолом для разработки эффективных схем диагностики патологических состояний.

Научная новизна полученных результатов заключается в получении новых данных о патогенетических изменениях в ГАМК-ергической системе, обусловленных однократным или длительным воздействием этанола. Можно выделить три блока исследований, в которых получены новые закономерности проявления интоксикации этанолом в зависимости от молекулярно-генетических процессов функционирования ГАМК-ергической системы. Это процессы экспрессии генов, особенности экспрессии генов при различных полиморфизмах, роль экспрессии и полиморфизма в проявлении тяжести интоксикации этанолом.

Выявлены 4 гена, экспрессия которых активируется при остром отравлении этанолом, причем набор этих генов отличается у предварительно

алкоголизированных крыс и не алкоголизированных. У хронически алкоголизированных крыс, напротив, выявлено достоверное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге. Определены гены (*Gabra2* и *Gabrb1*), снижение экспрессии которых определяет утяжеление клиники интоксикации у крыс при остром отравлении этанолом, причем, если это предварительно алкоголизированные крысы, то значение имеет снижение экспрессии другого гена - *Gabra4*.

Впервые установлено распределение частот генотипов изучаемых полиморфизмов у крыс. Выявлено влияние от одного до трех полиморфизмов на уровень экспрессии соответствующих генов у интактных крыс, а также предварительно алкоголизированных животных на фоне острого отравления этанолом и без него. Впервые установлена зависимость степени интоксикации крыс, перенесших острое отравление этанолом, от генотипа *Gabra2* rs105733011. Показано, что через 8 часов при остром отравлении этанолом «тяжелая степень интоксикации» наблюдается у крыс с гетерозиготным генотипом СТ. Повышенный риск гибели предварительно алкоголизированных крыс ассоциирован с генотипом АТ полиморфизма rs10509624 гена *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипами ТТ, GT полиморфизма rs197596713 гена *Gabra4* (спустя 8 часов).

Найденные автором закономерности имеют важное значение для последующей верификации у человека и индивидуального прогноза степени тяжести интоксикации при действии алкоголя. Такого рода молекулярно-генетические исследования составляют теоретическую и методическую основу персонализированной медицины.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Н.С.Осечкиной написана в классическом стиле, материал изложен последовательно, логично, на высоком научном уровне и грамотным литературным языком. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, а также списка использованных источников литературы и приложения. 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.

Во введении обоснована актуальность, сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту. Следует отметить четкую формулировку задач исследования, решение которых полностью отражено в тексте диссертации. Такой подход позволил достигнуть поставленной цели исследования.

Обзор литературы представлен тремя разделами, в которых описаны данные о типах эффектов и поражений при острой и хронической интоксикации этанолом; данные о молекулярно-генетических маркерах, характеризующих индивидуальную чувствительность к этанолу;

генетические особенности ГАМК-ергической системы, определяющие индивидуальный ответ организма на действие этанола. Проанализировано и обсуждено большое количество отечественных и зарубежных источников, в конце каждого раздела автор делает заключение о нерешенных вопросах, которые являются важными для достижения поставленной цели. В качестве основной модели исследования обоснованно выбраны гены ГАМК_A-рецептора, поскольку имеются данные о разнонаправленном изменении активности ГАМК-ергической системы при остром или хроническом потреблении алкоголя. Считают, что эти изменения обусловлены воздействием этанола на ионный канал ГАМК_A-рецептора нейронов, что приводит к увеличению его проницаемости для ионов хлора.

В главе «Материалы и методы исследования» представлены 15 разделов, подробно описывающих характеристику животных, исследуемого фактора и комплекс токсикологических, биохимических, молекулярно-генетических и статистических методов исследований. Общая схема проведения исследования и выбор методов исследования соответствуют поставленным цели и задачам данной работы. Оценку роли экспрессии генов и полиморфизма генов для возможности прогноза степени тяжести интоксикации этанолом проводили у четырех групп животных: интактных крыс, крыс, подвергнутых острой интоксикации с предварительной алкоголизацией или без нее, а также хроническому воздействию этанола. Эти схемы имеют и практическое значение, поскольку отражают возможные ситуации воздействия фактора в популяции человека.

В третьей и четвертой главах описаны результаты собственных исследований: оценка экспрессии генов ГАМК_A-рецептора при острой и хронической интоксикации этанолом и влияние полиморфных аллелей генов субъединиц ГАМК_A-рецептора на тяжесть угнетения ЦНС. При оценке определенного конкретного рецептора, одного из важных компонентов ГАМК-ергической регуляторной системы рассматривается общая биологическая проблема реализации генетических процессов на уровне фенотипа. В связи с этим хочется отметить вдумчивый подход автора не только к изучению генетических процессов, но и к оценке фенотипических реакций. Использование балльной системы оценки тяжести неврологических нарушений по В.А.Башарину (2011) позволило формализовать результаты изучения неврологических нарушений у крыс и сопоставить состояние экспериментальных животных с соответствующими степенями острого алкогольного отравления у человека. В работе учитывали возможность варьирования ответа на алкоголь и ЛД50 определяли для каждой партии животных. При оценке влияния полиморфизма генов на тяжесть угнетения ЦНС при острой интоксикации авторы нашли новый подход к решению проблемы: оценивали сгруппированные данные для животных с легкой и тяжелой степенью интоксикации. Особый подход применили к оценке значимости полиморфизма генов у предварительно алкоголизированных крыс,

поскольку картина распределения состояний отличалась от тех, у кого алкоголизации не было. В этом случае сравнение частот встречаемости генотипов проводили у животных с нелетальным и летальным исходом.

Такое же поэтапное преодоление трудностей наблюдается при оценке генетических процессов и структур. Проведен выбор референс-гена и его экспериментальная верификация. В качестве такого гена предложено использовать ген рибосомальной 18s рРНК, относящийся к числу генов «домашнего хозяйства». Отмечены противоречивые данные литературы об изменении экспрессии генов в разных тканях экспериментальных животных после отравления этанолом. В связи с этим проведены дополнительные исследования по изучению влияния этанола на экспрессию этих генов в образцах трех органов. В результате у всех экспериментальных животных не выявлено экспрессии изучаемых генов в крови и печени, в тоже время в образцах головного мозга была выявлена экспрессия всех исследуемых генов – *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1*, за исключением гена *Gabra6*.

Автор обосновывает выбор для дальнейшего исследования из ряда генетических маркеров однонуклеотидных точечных замен. Для определения приоритетных полиморфизмов в результате информационно-теоретического поиска выбраны и проанализированы более 1500 известных полиморфизмов. В итоге впервые выявлено генетическое разнообразие аллельных вариантов для 11 из 16 наиболее функционально значимых полиморфизмов, расположенных в разных частях генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора. Данные о полиморфизме генов крыс дополнены результатами изучения их уровней экспрессии.

Установлена ассоциация определенных полиморфных локусов со степенью интоксикации у крыс, перенесших острое отравление этанолом, а также определены полиморфизмы, определяющие повышенный риск гибели предварительно алкоголизированных крыс после введения этанола в дозе 0,8ЛД₅₀. Определено 3 полиморфных варианта генов *Gabra*, ассоциированных с «тяжелой степенью интоксикации» или повышенным риском гибели животных.

В заключении автор в сжатой форме описывает этапы решения поставленных задач, проводит их сравнительный анализ с имеющимися в литературе данными и обосновывает выводы работы.

Автором сформулированы 5 выводов и практические рекомендации.

Соответствие полученных результатов поставленной цели и задачам. Полученные автором результаты соответствуют четко поставленной цели и задачам. Научные положения, выносимые на защиту, и выводы логично сформулированы в соответствии с содержанием работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Достоверность и обоснованность результатов, полученных Н.С.Осечкиной, подтверждается большой экспериментальной работой, 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. Результаты работы отражены в виде достаточно подробных таблиц и рисунков, обсуждены на Всероссийских научно-практических конференциях, изложены в виде 8 печатных работ, из них 7 опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации. 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. Результаты исследования вносят вклад в развитие персонализированной медицины, имеют важное значение для клинической оценки степени интоксикации этиловым спиртом в зависимости от генетических особенностей ГАМК_A-рецептора. Подходы, используемые в работе, и полученные результаты позволяют рекомендовать их для верификации в клинических условиях.

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.

Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации. Автореферат базируется на результатах диссертационного исследования, его содержание полностью соответствует содержанию диссертации.

При рассмотрении диссертации возникли вопросы:

1. С чем может быть связана противоположно направленная экспрессия генов при острой и хронической интоксикации?
2. Какие аспекты проведенного исследования используются в работе лабораторий научно-исследовательских организаций ФМБА России и Министерства обороны РФ?
3. Насколько экономически эффективна предложенная схема мониторинга состояния больных при отравлении этанолом?

Принципиальных замечаний по диссертации и автореферату Н.С.Осечкиной нет.

Заключение

Диссертационное исследование Осечкиной Натальи Сергеевны «Прогнозирование тяжести интоксикации этанолом на основе генетических маркеров ГАМК_A-рецептора», представленное на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – Токсикология (биологические науки), представляет собой законченную квалификационную научную работу, выполненную автором самостоятельно и на высоком уровне. В работе содержится актуальная для токсикологии научная задача, направленная на разработку прогностических генетических маркеров ГАМК_A-рецептора, определяющих глубину депримирующего действия этанола, для повышения эффективности лечебно-профилактических мероприятий при острой интоксикации этанолом и алкоголизме.

По своей научной новизне, методическому решению цели и задач исследования, практической и теоретической значимости полученных результатов, степени обоснованности научных положений и выводов, представленная диссертационная работа Н.С. Осечкиной соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (с изменениями, утвержденными постановлением Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 – Токсикология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России
доктор биологических наук, профессор



Людмила Петровна
Сычева

Подпись ведущего научного сотрудника ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Л.П. Сычевой подтверждает:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России, заведующий Научно-организационным отделом, к.м.н.



Евгений Владимирович
Голобородько

Сведения о лице, представившем отзыв на диссертацию:

Сычева Людмила Петровна

Почтовый адрес: 123182, Москва, ул. Живописная, д. 46

Телефон: рабочий 8-499-190-95-54 (лаборатория); моб. 8(905)701-71-08

e-mail: lpsycheva@mail.ru

сайт: <http://www.fmbafmbc.ru>

Место работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России)

Должность: ведущий научный сотрудник

Число «16» февраль 2021 г.