

«УТВЕРЖДАЮ»



Директор ФГБУН Института
эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова
Российской академии наук
(ИЭФБ РАН)
доктор биологических наук



М.Л. Фирсов

«25» февраля 2021 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической значимости диссертации Осечкиной Натальи Сергеевны на тему **«Прогнозирование тяжести интоксикации этанолом на основе генетических маркеров ГАМК_A-рецептора» (экспериментальное исследование)**, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.04 - токсикология.

Актуальность темы диссертационной работы.

Этиловый спирт и его суррогаты относятся к числу нейротропных ядов, наряду с такими веществами как снотворные средства, психостимуляторы, транквилизаторы и многие другие. Среди причин, вызывающих преждевременную смерть, острые алкогольные отравления и алкоголизм занимают ведущее место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Множественность токсических эффектов этанола объясняется его физико-химическими характеристиками. 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. Каждый организм на воздействие токсиканта реагирует индивидуально, в зависимости от путей и скорости поступления токсиканта в организм, дозы, пола и возраста человека. В развитии токсических эффектов

этанол важная роль принадлежит нарушениям функций медиаторных систем головного мозга, в т.ч. ГАМК-ергической и глутаматергической. При воздействии этанола необходимо учитывать эффекты и его основного метаболита – ацетальдегида, который способен необратимо связываться с белками и фосфолипидами мозга и также обладает нейротропным и нейротоксическим действием. На формирование степени токсического поражения и предрасположенность к развитию определенных реакций существенное влияние оказывают наследственные факторы. Изучение генотипического профиля человека, выявление молекулярно-генетических маркеров позволит лучше оценить риск развития тяжелых форм депримирующего действия этанола. Работа Осечкиной Н.С. направлена на решение именно этих вопросов, что обуславливает актуальность этой работы для токсикологии.

Связь работы с планом соответствия отраслей науки и народного хозяйства.

Диссертационная работа Осечкиной Натальи Сергеевны на тему «Прогнозирование тяжести интоксикации этанолом на основе генетических маркеров ГАМК_A-рецептора» 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».

Научная новизна исследования и полученных результатов.

В диссертационном исследовании автором впервые исследовано влияние острой и хронической интоксикации этанолом на профиль экспрессии генов, кодирующих $\alpha 1-6$ и $\beta 1$ -субъединиц ГАМК_A-рецептора крыс в различных органах и крови лабораторных животных. Впервые 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 экспрессии генов *Gabra5* и *Gabrb1* в головном мозге предварительно алкоголизированных крыс. Впервые показано, что после хронической алкоголизации этанолом происходит достоверное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс. Также впервые получены данные о связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола. 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*. Также выявлено распределение частот генотипов *Gabra1-6* и *Gabrb1* в популяции белых беспородных крыс из питомника «Рапполово». Генетическое разнообразие аллельных вариантов выявлено для 11 полиморфизмов. Обнаружено, что полиморфные локусы генов *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabrb1* приводят к изменению уровня их экспрессии. Впервые установлена зависимость степени интоксикации крыс, перенесших острое отравление этанолом, от генотипа *Gabra2* rs105733011. Показано, что наличие у крыс гетерозиготного генотипа СТ определяет тяжелую степень интоксикации спустя 8 часов после острого отравления этанолом. На модели предварительно алкоголизированных крыс выявлены новые факторы повышенного риска гибели крыс при отравлении этанолом.

Значимость результатов, полученных автором диссертации, для науки и практики.

Научно-практическая значимость полученных результатов состоит в том, что они дополняют имеющиеся представления о патогенетических изменениях в ГАМК-ергической системе, обусловленных однократным или длительным воздействием этанола, а также расширяют наши представления о

влиянии молекулярно-генетических особенностей ГАМК_A-рецептора на степень депримирующего действия этанола на нервную систему. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования генетических особенностей ГАМК_A-рецептора для определения различных отклонений нервной системы, которые возникают при интоксикации этанолом.

Генетические маркеры ГАМК_A-рецептора, определяющие степень интоксикации крыс этанолом и риска гибели предварительно алкоголизованных крыс используются в практической научно-исследовательской деятельности ФГБУН ИТ ФМБА России при проведении работ по оценке тяжести неврологических нарушений при отравлении этанолом, внедрены в практику работы других научно-исследовательских организаций ФМБА России и Министерства обороны РФ.

Обоснованность используемых методов, а также полученных результатов и положений диссертации.

Экспериментальные исследования выполнены на половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область), с соблюдением отечественных и международных правил и норм гуманного обращения с животными. В качестве токсического агента использовали спирт этиловый 95%, который вводили внутривентриально в виде 33% водного раствора. В качестве токсикометрического параметра этанола определяли его среднюю смертельную дозу (ЛД₅₀), которую вычисляли предварительно перед каждой серией экспериментов табличным экспресс-методом.

Профиль экспрессии целевых генов исследовали на 4 группах животных, общее количество которых составило 145. Определение уровней экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, проводили в крови, а также в головном мозге и печени, где изменения играют определяющую роль в патогенезе алкогольной болезни. Из отделов головного мозга

для исследования был выбран гиппокамп, где важную роль в регуляции возбудимости играет ГАМК-ергическая система.

Результаты, полученные в ходе исследования, обработаны с применением современных методов статистики, что дало возможность автору получить объективную и достоверную информацию, а также аргументированно и убедительно обосновать научные положения, выводы и практические рекомендации, изложенные в диссертации. Выводы и практические рекомендации логично вытекают из основных положений работы, в полной мере отражают основные результаты выполненного исследования, полностью соответствуют поставленным задачам. Материалы диссертации изложены на 173 страницах, иллюстрированы 26 таблицами, 31 рисунком и включают в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и условных обозначений, словарь терминов, а также список использованных источников в количестве 208, из них 100 русскоязычных и 108 англоязычных.

Автореферат диссертации Осечкиной Натальи Сергеевны на тему «Прогнозирование тяжести интоксикации этанолом на основе генетических маркеров ГАМК_A-рецептора» полностью соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями. В нем отражено содержание исследования и полученные результаты. Выводы, представленные в автореферате, полностью соответствуют таковым, приведенным в диссертации.

Замечания по диссертационной работе.

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационного исследования Н.С. Осечкиной нет. Несмотря на то что диссертация в целом изложена достаточно хорошим профессиональным и литературным языком, имеются грамматические и стилистические погрешности. Так, представляется избыточным с точки зрения токсикологической

характеристики состояния организма словосочетание «глубина тяжести угнетения». Неуместно писать «на сегодняшний день» вообще, и уж тем более цитируя при этом работы 2011 и 2015 годов. Небольшое искажение токсикологического термина «депрессирующий» превращает его в термин социально-экономический. Аналогично, словосочетание «бальная система» с одной буквой «л» наводит на мысли о хореографии. В русскоязычной литературе не принято написание «ген-рефери», правильно писать «референсный ген». Говоря о маркерах, надо понимать, что они являются категориями диагностики и в качестве таковых должны иметь количественные метрологические характеристики, главные из которых - чувствительность и специфичность, а в контексте данной работы чрезвычайно важной представляется прогностическая значимость. К сожалению, эти характеристики в работе отсутствуют, а без них трудно понять степень преимущества генетических маркеров перед более простыми для выявления физиолого-биохимическими.

Указанные замечания и недостатки не снижают общую положительную оценку диссертации, но должны быть учтены автором в дальнейшей научной работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Осечкиной Натальи Сергеевны на тему «Прогнозирование тяжести интоксикации этанолом на основе генетических маркеров ГАМК_A-рецептора» (экспериментальное исследование) является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научная задача токсикологии – расширение представлений о генетической предрасположенности к развитию определенных реакций при токсическом поражении этанолом.

Диссертационная работа Осечкиной Н.С. полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологи-

ческих наук, а ее автор Осечкина Наталья Сергеевна заслуживает присуждения искомой степени по специальности 14.03.04 - токсикология.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании лаборатории сравнительной биохимии ферментов Федерального государственного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН), протокол №2 от 19 февраля 2021 г.

Главный научный сотрудник,

зав. лабораторией сравнительной биохимии ферментов

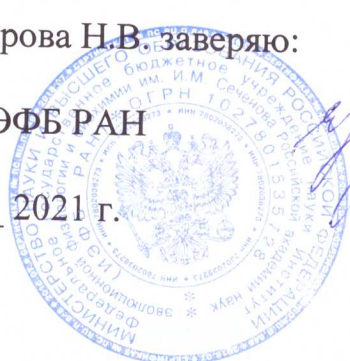
доктор биологических наук

Н.В. Гончаров

Подпись д.б.н. Гончарова Н.В. заверяю:

Ученый секретарь ИЭФБ РАН

«25» февраля 2021 г.



Е.И. Гальперина

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральное государственное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Сокращенное название: ИЭФБ РАН.

Адрес: 194223, г. Санкт-Петербург, просп. Тореза, д.44.

Телефон: (812) 552-7901, факс: (812) 552-3012

e-mail: office@iephb.ru <http://http.www.iephb.ru/>