

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Гуляевой Наталии Валерьевны на диссертацию Ереско Сергея Олеговича «Нейрохимический и фармакологический анализ системы toll-подобных рецепторов головного мозга крыс при действии этанола», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научным специальностям:

1.5.4. Биохимия, 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

В работе Сергея Олеговича Ереско исследована динамика экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга крыс в моделях хронической алкоголизации, отмены этанола, а также на фоне фармакотерапии. Автором показано, что 1-месячная алкоголизация не оказывала существенного влияния на экспрессию генов TLR3/4/7 в эмоциогенных структурах мозга крыс, а значимые нарушения экспрессии генов TLR3/4/7 и провоспалительных цитокинов IL-1 β и CCL2 происходили после отмены этанола. Обнаружена положительная корреляция между уровнем экспрессии генов TLR3/4/7 и провоспалительных цитокинов IL-1 β и CCL2, что может указывать на ассоциацию TLR3/4/7 с нейровоспалением при потреблении этанола. При длительной алкоголизации повышение экспрессии эндогенного активатора рецепторов TLR (секреторного белка Hmgb1) и изменение содержания miR-155, miR-let7b, miR-96, miR-182 в эмоциогенных структурах мозга может вносить вклад в развитие нейровоспаления. При отмене этанола после хронической алкоголизации показано противовоспалительное действие антибиотика широкого спектра действия рифампицина, который снижает экспрессию генов нейровоспаления и активирует гены противовоспалительных цитокинов Il10 и Il11 в n. accumbens. Использование в этой ситуации тритерпеновых гликозидов женьшеня гинзенозидов оказывало корригирующее действие на экспрессию генов toll-подобных рецепторов в n. accumbens и гиппокампе.

Актуальность выполненного исследования не вызывает сомнения в связи с серьезными проблемами, связанными с распространенностью алкоголизма во всем мире, включая Россию. Как хроническое потребление алкоголя, так и абстиненция влияют на функционирование мозга, приводя к психоневрологическим последствиям. С одной стороны, важно изучить закономерности и молекулярные механизмы патологических процессов в мозге в результате злоупотребления этанолом, а с другой стороны необходим поиск препаратов, купирующих эти изменения и исследование механизмов их действия.

Новизна работы связана с впервые проведенным автором систематическим анализом экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в структурах мозга крыс при хроническом потреблении этанола, его отмене и коррекции патологических изменений рифампицином и гинзенозидами. Полученные данные являются новыми как для отечественной, так и для мировой литературы, так как анализ экспрессии серии генов из системы toll-подобных рецепторов в исследованных структурах головного мозга ранее не выполнялся. Показано, что антибиотик рифампицин и гинзенозиды могут в значительной степени купировать патологические изменения экспрессии ряда генов из системы toll-подобных рецепторов и потенциально препятствовать развитию нейровоспаления.

Данные о дифференциальном вовлечении генов системы toll-подобных рецепторов в молекулярные механизмы, опосредующие действие этанола в стриатуме, прилежащем ядре, гиппокампе, миндалинах и энторинальной коре определяют высокую **научно-теоретическую значимость** исследования. Результаты, показывающие роль toll-подобных рецепторов и цитокиновой системы в корригирующих эффектах рифампицина и гинзенозидов также имеют важное значение для фундаментальной медицины, нейробиологии и фармакологии.

Практическая значимость работы определяется как углублением понимания биохимических механизмов, связанных с участием TLR-системы в патогенезе алкоголизма и абстиненции, что позволяет выявить новые потенциальные мишени для разработки соответствующей терапии, так и выявлением новых механизмов действия гинзенозидов женьшеня и антибиотика рифампицина, потенциально расширяющих область их применения в клинике.

Результаты обработаны статистически и представляются достоверными, хотя имеются замечания к их представлению (см. ниже). Основная часть представленного в диссертации материала изложена в 5 статьях, индексированных в базе Scopus и ряде других отечественных и международных баз.

Вопросы и замечания:

Описание методов

1. Не указаны условия содержания животных (тип клетки, количество животных в клетке). В экспериментах такого типа, как проведенные в данном исследовании, принято содержать животных при 12-часовом световом цикле и постоянной температуре. Само по себе различие светового и температурного режима в разных экспериментах затрудняет их сравнение. Поэтому нужно четко указать, в какие месяцы проводили эксперименты и в какое время дня проводили манипуляции с животными.
2. Хотя указано, что были использованы группы животных с $n=10$, ниже при описании различных серий экспериментов (напр. пп. 2.6-2.7) приведены другие значения n , которые противоречат этому утверждению.
3. Неясно утверждение, почему именно 10 животных было достаточно для получения статистически достоверных данных (тем более, что затем использовались и меньшие группы). Перед началом исследования должна быть проведена статистическая оценка - предопределение размера оптимальной выборки, обеспечивающее мощность не менее 0.8, и описание расчетов размера выборки должны быть включены в текст работы (все параметры расчета и оценка величины мощности).
4. Не описаны процедуры слепого метода для каждого эксперимента (кто был слеп, к какой процедуре во время исследования, т. е. экспериментатор не знал о группе животных во время эксперимента, во время (статистического) анализа и т. д.).
5. В п. 2.2. приведены очень кратко, без необходимых подробностей протоколы экспериментов. Оптимально было бы привести графическую временную шкалу или блок-схему плана исследования / экспериментальной процедуры (включая количество животных в группе и количество исключенных животных).

Статистика

1. В описании этого раздела не приведено обоснование проведенных статистических анализов. Например, неясно, почему не использовали дисперсионный анализ с последующими апостериорными сравнениями.
2. Не указано, была ли проведена оценка (и какая) нормальности данных, был ли проведен тест на выбросы (и какой), были ли исключены какие-либо точки.
3. Для небольших выборок необходимо с помощью анализа статистической мощности показать, что объем выборки достаточен для получения достоверных результатов.
4. Уровень взаимосвязи между двумя сравниваемыми переменными определяли по коэффициенту детерминации (R^2). Такой выбор требует обоснования, потому что, в зависимости от распределения, в подобных исследованиях принято использовать корреляции по Спирмену или Пирсону.

Представление результатов

1. На графиках необходимо указывать отдельные точки данных (обязательно для небольших выборок $n < 15$) в виде точечной диаграммы или использовать прямоугольные диаграммы с указанием минимума и максимума разброса экспериментальных данных вместо простых гистограмм. Дополнительную информацию о том, почему это важно, можно найти здесь:
<https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002128>.
2. Значения n для групп необходимо указывать в подписях под каждым рисунком или на самих рисунках.

Высказанные замечания и вопросы необходимо учесть в дальнейших исследованиях автора, однако они не изменяют общего позитивного впечатления о представленной работе.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Ереско Сергея Олеговича на тему «Нейрохимический и фармакологический анализ системы toll-подобных рецепторов головного мозга крыс при действии этанола» соответствует специальностям 1.5.4. Биохимия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Диссертация Ереско Сергея Олеговича на тему «Нейрохимический и фармакологический анализ системы toll-подобных рецепторов головного мозга крыс при действии этанола» является научно-квалификационной работой, в которой раскрыта роль системы toll-подобных рецепторов в структурах мозга при хроническом потреблении этанола, его отмене и коррекции антибиотиком широкого спектра действия рифампицином и тритерпеновыми гликозидами женьшеня гинзенозидами. Решение этой научной задачи важно для фундаментальной медицины, нейробиологии и фармакологии с точки зрения не только углубления понимания молекулярных механизмов развития алкоголизма и абстинентного синдрома, но и для разработки инновационных подходов к коррекции патологических проявлений зависимых от алкоголя состояний.

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук мною не установлено.

Заключение:

Диссертация Ереско Сергея Олеговича на тему «Нейрохимический и фармакологический анализ системы toll-подобных рецепторов головного мозга крыс при действии этанола» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», а соискатель Ереско Сергей Олегович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических по научным специальностям: 1.5.4. Биохимия, 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Член диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник,
руководитель лаборатории функциональной
биохимии нервной системы,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт высшей нервной
деятельности и нейрофизиологии
Российской академии наук, г. Москва

Гуляева

Н.В. Гуляева



Подпись т. Гуляевой Н.В.

УДОСТОВЕРЯЮ

Зав. канц. ИВНД и НО Гуляева

Гуляева Н.В.