

ОТЗЫВ

председателя диссертационного совета Шамовой Ольги 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.

Актуальность диссертационного исследования.

Последствия от систематического поступления алкоголя в организм представляют большую проблему как для клиницистов, занимающихся лечением и реабилитацией пациентов с такого рода расстройствами, так и для исследователей, изучающих фундаментальные патогенетические механизмы, которые связаны с накоплением и длительным содержанием в организме этанола и продуктов его метаболизма. Данные патогенетические механизмы можно изучать с применением различных методов и подходов, в том числе, набора биохимических методик, которыми воспользовался диссертант в своем исследовании. Цель работы заключалась в изучении динамики экспрессии генов системы Toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга крыс в условиях хронической алкоголизации, отмены этанола и на фоне фармакотерапии. Система Toll-подобных рецепторов традиционно рассматривается иммунологами как ключевая система врожденного иммунитета, направленная на распознавание антигенов разной природы. Эти рецепторы имеются и на клетках нервной системы. В ряде исследований последних лет сообщается, что хроническое поступление этанола приводит к повышению экспрессии генов нескольких подтипов Toll-подобных рецепторов (TLR3, TLR4, TLR7) в коре головного мозга, однако не проводилось комплексного анализа в этом направлении для других структур мозга. Таким образом, исследования, направленные на анализ системы Toll-подобных рецепторов среди различных структур головного мозга, и выявление изменений, ассоциированных с развитием алкоголизма, представляются высоко востребованными. Актуальной задачей, несомненно, является и поиск потенциальных фармакологических средств, направленных на коррекцию имеющихся нарушений функционирования этой системы.

Оценка научной новизны диссертационного исследования.

Автором диссертационного исследования впервые установлено, что длительное воздействие этанола не вызывает существенных изменений в экспрессии генов *Tlr3*, *Tlr4* и *Tlr7* в исследованных им структурах головного мозга крыс (амигдала, гиппокамп, стриатум, медиальная энторинальная кора). Однако отмена этанола вызывает дисбаланс в экспрессии этих генов, а также генов провоспалительных цитокинов (*Il1 β* и *Ccl2*), которые функционально связаны с Toll-подобными рецепторами. Диссертантом охарактеризован уровень экспрессии генов эндогенных агонистов Toll-подобных рецепторов, в том числе *Hmgb1*, в различных структурах мозга крыс. Впервые получена информация о том, что уровень экспрессии этих генов подвержен изменениям при хронической алкоголизации. Эти данные позволяют сделать предположение о том, что уровень агонистов Toll-подобных рецепторов может повышаться не только на периферии, но и непосредственно в структурах головного мозга, а их высвобождение в межклеточное пространство может вносить изменения в функционирование Toll-подобных рецепторов, некоторые из которых расположены на мембранах клеток нервной ткани. Эти сведения являются также оригинальными, так как в литературе, в основном, обсуждается вопрос о повышении уровня агонистов Toll-подобных рецепторов на периферии (например, поступающих из кишечника) и предполагается, что в дальнейшем они транспортируются в нервную ткань или действуют на неё опосредованно, через афферентные нервные волокна. Важным результатом работы является и то, что были впервые получены сведения об изменении экспрессии исследованных диссертантом генов в различных структурах головного мозга при отмене хронического поступления этанола в организм. Причем эти изменения обнаружены при моделировании длительного воздействия этанола при использовании различных протоколов, где дозировки и длительность воздействия различались. Исследовано содержание микро-РНК (*miR-155*, *miR-let7b*, *miR-96*, и *miR-182*) в мозге крыс при длительном воздействии этанола. Наиболее выраженные изменения на уровне мРНК были выявлены в гиппокампе мозга крыс. В работе показано, что анализируемые биохимические показатели, полученные при оценке содержания молекул мРНК и микро-РНК методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, вызванные длительным воздействием этанола, имеют различный характер среди исследованных структур головного мозга.

Оригинальными являются и данные, полученные при анализе экспрессии серии генов системы Toll-подобных рецепторов после фармакологической коррекции с помощью соединений, действие которых направленно на подавление активности

клеток системы врожденного иммунитета. Из литературы известно, что гинзенозиды женьшеня обладают иммуномодулирующими свойствами. На основании того, что в составе гинзенозидов имеются гидрофобные участки (в составе агликона), диссертант выдвинул предположение о том, что такие соединения обладают способностью проникать через гематоэнцефалический барьер и, таким образом, влиять на функционирование клеток иммунной природы в нервной ткани. В обзоре литературы он обобщил результаты исследований по применению гинзенозидов для коррекции нейровоспалительного процесса в головном мозге при различных видах патологии, отметив при этом, что анализ экспрессии генов Toll-подобных рецепторов после применения гинзенозидов до настоящего времени не исследовался. Таким образом, анализ экспрессии этих генов при моделировании данного патологического процесса и корригирующем действии гинзенозидов, полученных диссертантом из суспензионной культуры клеток женьшеня японского, был выполнен впервые. Диссертант сделал заключение, что для коррекции патологического процесса, проходящего в разных структурах мозга, в частности гиппокампе и прилежащем ядре, нужно применять различные дозировки и способы введения препаратов гинзеноидов

Теоретическая и практическая значимость.

Научно-теоретическая значимость работы определяется доказательством вовлеченности генов системы Toll-подобных рецепторов при отмене этанола в патогенетические молекулярные механизмы в ряде структур головного мозга, таких как стриатум, прилежащее ядро, гиппокамп, миндалевидное тело, энторинальная кора. В работе показано, что независимо от способа моделирования длительного воздействия этанола отмечаются изменения в экспрессии генов системы Toll-подобных рецепторов, а также то, что активность исследуемых генов разнонаправленно изменяется в различных структурах мозга в ответ на отмену хронического поступления этанола. Теоретическая, как и практическая значимость диссертационной работы, заключатся и в том, что в работе были получены сведения о способности гинзенозидов женьшеня и рифампицина влиять на экспрессию генов системы Toll-подобных рецепторов, что еще раз указывает на то, что иммуномодулирующий эффект этих соединений может быть опосредован их вовлечением в молекулярные механизмы TLR-сигнализации.

Практическая значимость работы состоит и в том, что полученные данные об изменении экспрессии генов TLR-системы предоставляют информацию о механизмах развития патологического процесса в исследованных структурах головного мозга вследствие длительного поступления этанола в организм, что создает предпосылки для использования данных механизмов в качестве фармакологических мишеней для

коррекции этих нарушений. Другим практическим результатом работы установленное свойство используемых в работе фармакологических субстанций - гинзенозидов женьшеня и антибиотика рифампицина, выступать в роли корректоров нарушений, связанных с изменением экспрессии генов системы Toll-подобных рецепторов.

Структура диссертационного исследования

Диссертация построена по классической схеме, представлена на 115 страницах машинописного текста, содержит 3 таблицы и 33 рисунка, оформлена в соответствии с современными требованиями, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и списка литературы, включающего 178 источников, в том числе 30 отечественных и 148 зарубежных.

Раздел «Введение» раскрывает актуальность проблемы и отражает суть исследования в целом. Цели и задачи работы четко сформулированы. «Обзор литературы» содержит главы, построенные по логичной схеме, изложенные четко и последовательно. Проанализирован большой объем научной литературы по тематике работы, представлены современные представления о системе Toll-подобных рецепторов, их роль в ЦНС, нарушения при алкоголизме. Текст обзора хорошо проиллюстрирован, легко воспринимается. Мне понравилось то, что все многочисленные аббревиатуры расшифрованы. В разделе «Материалы и методы» детально описаны использованные методики и протоколы исследования. Глава «Результаты собственных исследований» включает 5 основных разделов, где приводятся полученные данные, обработанные с помощью адекватных статистических методов. Достоверность результатов исследования не вызывает сомнений. Раздел «Обсуждение результатов исследования» содержит детальный анализ рассматриваемых проблем. Автор проводит тщательный анализ полученных данных в сравнении с описанными в литературе наблюдениями.

В заключении подводятся общие итоги исследования, показывается значимость полученных результатов и перспективы развития этого направления. Раздел «Выводы» отсутствует, все основные итоги работы приведены в разделе «Заключение».

В качестве **критических замечаний** могу отметить следующее:

В целом, текст диссертации изложен хорошим стилем, но встречаются довольно многочисленные опечатки, некоторые неудачные стилистические обороты. Например, в Положениях, выносимых на защиту, написано: «отмена этанола стимулирует резкий

дисбаланс...». Считаю, что дисбаланс нельзя стимулировать, его можно вызвать, индуцировать, обусловить, усугубить и т.п. Опечатки порой носят курьезный характер, например, в разделе Заключение вместо «...в эксперименте...» написано «...в эксcremente...» (стр. 93). Иллюстрации в разделе «Результаты» воспринимаются сложно, так как столбики на графиках отмечены практически одинаковым серым цветом. Следовало использовать штриховку.

В разделе «Обсуждение» имеются повторы с разделом «Обзор литературы», например, на стр. 26 – стр. 79 – стр. 87; стр. 37 – стр. 82 и др., вследствие чего раздел «Обсуждение» кажется перегруженным.

Данные замечания не имеют принципиального характера.

В порядке дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

1. В разделе «Заключение» диссертационной работы Вами сообщается, что характер экспрессии исследуемых генов зависел не только от срока отмены этанола, но и от региона головного мозга, а также и от моделирования воздействия этанола. Каким образом, по Вашему мнению, может сказываться разный способ моделирования воздействия этанола на исследуемые в работе механизмы?
2. Последствия длительного воздействия этанола на уровень экспрессии исследуемых Вами генов был оценен в ряде структур головного мозга, однако анализ после фармакологического воздействия был выполнен в двух структурах головного мозга – в гиппокампе и в прилежащем ядре. В связи с чем пришелся выбор при анализе фармакологического воздействия именно на эти структуры головного мозга?
3. По литературным данным – скажите, пожалуйста, как изменяется экспрессия генов Toll-подобных рецепторов на клетках системы врожденного иммунитета человека при долговременном потреблении алкоголя? Есть ли разница в протекании процесса нейровоспаления (в частности, связанная с функционированием TLR), длительности восстановительного периода после черепно-мозговой травмы у алкоголиков и у пациентов, не имеющих алкогольной зависимости? Есть ли отличия в протекании инфекционного процесса, в целом, у этих категорий пациентов, обусловленная различием в экспрессии генов Toll-подобных рецепторов?

Данные критические замечания и вопросы не снижают общей положительной оценки работы.

Заключение:

Содержание диссертации Ереско Сергея Олеговича на тему: «Нейрохимический и фармакологический анализ системы toll-подобных рецепторов головного мозга крыс

при действии этанола» соответствует научным специальностям: 1.5.4. Биохимия, 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Диссертационная работа Ереско Сергея Олеговича является самостоятельным завершенным научным исследованием, выполненным на современном методологическом уровне, в котором получены важные научно-практические результаты, позволяющие оптимизировать диагностику и оценку прогноза хронического воздействия алкоголя.

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

Диссертация рекомендована к защите в СПбГУ и соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, установленными приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», а ее автор Ереско Сергей Олегович достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по соответствию научным специальностям: 1.5.4. Биохимия, 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Председатель диссертационного совета,
профессор кафедры биохимии,
и.о. зав. кафедрой биохимии СПбГУ,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН



Шамова Ольга Валерьевна

25.11.2024