

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО

«Первый Санкт-Петербургский

государственный медицинский университет

им. акад. И.П. Павлова»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации

академик РАН, д.м.н., профессор



 Ю.С. Полушин

2024 года

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертационной работы Ереско Сергея Олеговича на тему: «Нейрохимический и фармакологический анализ системы toll-подобных рецепторов головного мозга крыс при действии этанола», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научным специальностям: 1.5.4.Биохимия и 3.3.6.Фармакология, клиническая фармакология.

#### Актуальность темы диссертации

Систематическое злоупотребление алкоголем является серьезной медико-социальной проблемой общества. Длительное хроническое употребление алкоголя, в частности, вызывает дефицит когнитивных функций и нарушение морфологии мозга независимо от возраста. К настоящему времени сложилось представление о том, что токсическое действие этанола, может быть связано с активацией генов системы врожденного иммунитета. В связи с этим, актуальными являются

исследования, направленные на установление роли ключевой системы врожденного иммунитета – toll-подобных рецепторов структур головного мозга в развитии хронической алкогольной интоксикации, а также исследования по поиску новых фармакологических агентов для коррекции воспалительных процессов в нервной ткани, индуцированных этанолом. В частности, к таким соединениям могут быть отнесены гинзенозиды женьшеня и рифампицин, которые, по данным литературы, зарекомендовали себя как средства для коррекции нейровоспаления при различных патологических состояниях нервной системы. Таким образом, представленная диссертационная работа, целью которой являлось изучение динамики экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в различных структурах головного мозга крыс в условиях хронической алкоголизации, отмены этанола, и на фоне фармакотерапии, представляет собой актуальное исследование.

#### **Научная новизна исследования**

В диссертации впервые выполнен анализ экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов в подкорковых структурах головного мозга у крыс с хронической алкоголизацией, а также на разных сроках отмены этанола. Установлено, что уровень экспрессии гена *TLR3* не был подвержен изменениям в большинстве исследованных структур мозга (стриатум, прилежащее ядро, миндалевидное тело, энторинальная кора), а экспрессия генов *TLR4* и *TLR7* не была изменена ни в одной из исследованных структур головного мозга. При отмене этанола на разных сроках уровень экспрессии генов *TLR3*, *TLR4* и *TLR7* имел разнонаправленный характер. Уровень экспрессии генов зависел не только от сроков после прекращения получения этанола и зоны ЦНС, но также и от типа моделирования воздействия этанола, т.е. от продолжительности и концентрации получаемых доз раствора этанола.

В работе оценено влияние фармакологической коррекции изменённых молекулярных механизмов при длительном воздействии этанола в таких структурах головного мозга как гиппокамп и прилежащее ядро прозрачной

перегородки. Результаты исследования показали, что введение гинзенозидов женьшеня и рифампицина сопровождается восстановлением уровня экспрессии ряда генов из системы toll-подобных рецепторов.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов основана на использовании комплекса современных методов исследования и достаточном количестве экспериментальных данных. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и международных конференциях: научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2024» (г. Санкт-Петербург, 2024 г.), на X юбилейном всероссийском форуме молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024» (г. Калининград, 2024 г.) на международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (г. Санкт-Петербург, 2024 г.), на V Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (г. Санкт-Петербург, 2023 г.), на международной конференции, посвященной 100-летию И.А. Држевецкой «Психофизиология и психонейроэндокринология» (г. Ставрополь, 2022 г.) и др. По материалам диссертации опубликовано 19 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых журналах, входящих в базу данных Scopus, и 14 тезисов докладов.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, носят фундаментальный характер. Доказано вовлечение генов системы toll-подобных рецепторов в молекулярные изменения, связанные с длительным воздействием этанола и его отменой, в ряде структур головного мозга, таких как полосатое тело, прилежащее ядро прозрачной перегородки, гиппокамп, миндалевидное тело, энторинальная кора. В диссертационном исследовании



показано, что разные модели длительного воздействия этанола разнонаправленно изменяют экспрессию генов системы toll-подобных рецепторов, а также то, что различные структуры головного мозга реагируют разнонаправленно на длительное воздействие этанола, а также отмену его поступления. Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в том, что в работе получены сведения о потенциальной способности гинзенозидов женьшеня и рифампицина корректировать вызванные хроническим действием этанола изменения экспрессии генов TLR-системы. Это указывает на то, что давно известный иммуномодулирующий эффект этих соединений может быть опосредован через систему toll-подобных рецепторов.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные данные об изменении экспрессии генов TLR-системы вскрывают один из патогенетических путей в исследованных структурах головного мозга, которые вовлечены в механизмы формирования алкогольной зависимости. В совокупности, полученные результаты могут быть расценены как предпосылка для использования данных сигнальных путей в качестве фармакологических мишеней для коррекции изменений, вызванных длительным воздействием этанола. Также установлено, что гинзенозиды женьшеня и рифампицин обладают корректирующим эффектом в отношении изменённой экспрессии генов системы toll-подобных рецепторов. Другим практическим результатом исследования является выявление нового патогенетического молекулярного механизма, который при длительном воздействии этанола на ткани мозга через систему toll-подобных рецепторов может регулироваться вплоть до восстановления по ряду показателей до уровня контрольных значений при использовании фармакологических субстанций.

#### **Оценка содержания диссертации**

Диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов

исследования, их обсуждения, заключения, а также включает список сокращений и условных обозначений, список литературы. Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и содержит 3 таблицы и 33 рисунка. Библиографический указатель включает 178 публикаций на русском и английском языках.

В обзоре литературы автор описывает современную нейровоспалительную теорию, которая вносит вклад в понимание механизмов формирования алкогольной зависимости. Особое внимание уделяется описанию участия toll-подобных рецепторов системы врождённого иммунитета и её участия в нейроиммунных механизмах алкогольной аддикции. Автор отмечает, что наибольшее количество работ посвящено изучению роли TLR4 и HMGB1 (негистоновый хромосомный белок) в механизме активации провоспалительной сигнализации в результате потребления этанола. При этом отмечено, что роль TLR7 в патогенезе алкоголизма изучена недостаточно. Также проведен обзор литературы по miR, которые вовлечены в ключевые механизмы, определяющие развитие нейровоспаления и нейродегенерации в результате длительного употребления этанола. В обзоре литературы обобщены данные о биологически активных соединениях растительного происхождения, которые способны подавлять нейровоспаление посредством изменения состояния системы TLR-сигнализации и обсуждается перспективность их использования в качестве средств фармакологической коррекции нейровоспаления при алкогольной патологии.

Исследование выполнено на самцах крыс стока Wistar. Для моделирования длительного воздействия этанола использовали принудительное питьё 20% раствора этанола (бутылка с ним была единственным источником жидкости для таких животных) или внутрижелудочное введение раствора этанола. Для фармакологической коррекции использовали гинзеноиды женьшеня, полученные путем экстракции из культуры женьшеня японского, и рифампици. Для



количественного анализа и идентификации фракций гинзенозидов использовали метод ВЭЖХ и масс-спектрометрию. Структуры головного мозга крыс (полосатое тело, прилежащее ядро прозрачной перегородки, гиппокамп, миндалевидное тело, энторинальная кора) изымали в соответствии с атласом мозга крысы для последующей экстракции общей РНК. кДНК синтезировали в реакции обратной транскрипции и определяли уровень относительной экспрессии 18 генов методом ПЦР в реальном времени.

В главах «Результаты» и «Обсуждение результатов» диссертант детально и последовательно описывает полученные данные. В обсуждении результатов автор сопоставляет их со сведениями, представленными в современных публикациях.

В обсуждении диссертант предполагает, что изменения в экспрессии гена *TLR3* в лимбических структурах головного мозга в период отмены этанола могут быть связаны не только с вовлеченностью *TLR3* в активацию экспрессии генов провоспалительного ответа, но и в развитие механизмов, направленных на повышение уровня патологического влечения к алкоголю в период отмены. Диссертант также рассуждает о том, что *TLR4* может опосредованно изменять активность нейромедиаторных систем, что может вносить определённый вклад в патогенез алкоголизма. При этом диссертант указывает и на то, что полученные данные об экспрессии генов провоспалительных цитокинов в гиппокампе могут быть признаком наличия длительного нейровоспалительного процесса в период отмены алкоголя. Показано, что данные по изменению мРНК *TLR7* не могут быть однозначно интерпретированы, так как работ, уделяющих внимание *TLR7*-зависимой сигнализации в головном мозге немного. При обсуждении результатов по коррекции рифампицином диссертант сообщает, что полученные данные свидетельствуют о возможной коррекции препаратом нейровоспалительных состояний, однако механизм его действия, возможно, имеет более сложный характер, связанный не только с конкуренцией рифампицина с лигандами

TLR4 за связывание с белком MD2. Обсуждая полученные результаты по применению гинзенозидов также сообщается, что были получены ожидаемые результаты по снижению активности исследуемых генов нейровоспаления, но все же инъекции гинзенозидов скорректировали данное состояние лишь в прилежащем ядре головного мозга, что указывает на разнонаправленный характер действия суммы гинзенозидов в отношении различных структур головного мозга.

Выводы, которые были сформулированы в ходе анализа полученных данных, а также их сопоставление с литературными сведениями представлены в разделе «Заключение». Выводы в работе четко сформулированы и соответствуют поставленной цели и задачам. По существу диссертации возник ряд вопросов и замечаний.

### **Вопросы**

1. Необходимо указать особенности моделей алкоголизации крыс, которые использовались в диссертационном исследовании, а также их трансляционный потенциал.
2. Чем обоснован выбор структур головного мозга для анализа экспрессии генов при длительном воздействии этанола? Как можно объяснить несогласованные изменения профиля экспрессий генов, участвующих в нейровоспалении, в разных структурах мозга?
3. В разделе материалы и методы указано, что содержание мРНК целевых генов и miR нормировалось к уровням экспрессии генов *GAPDH* и *U6*, соответственно. Почему именно *GAPDH* и *U6* были выбраны в качестве конститутивных генов для расчета нормированной экспрессии? Есть ли подтверждения, что уровни экспрессии *GAPDH* и *U6* не изменяются при воздействии этанола? Использовались ли другие конститутивные гены для расчета нормированной экспрессии мРНК целевых генов и miR?
4. Чем был обоснован выбор нейропротекторов и почему в эксперименте использовалась именно сумма гинзенозидов, а не индивидуальные представители этого класса соединений?



5. Как диссертант обосновывает выбор дозы и режима введения рифампицина и суммы гинзенозидов?
6. Согласно данным работ зарубежных авторов, доза рифампицина 100 мг/кг/раз в сутки обладает гепатотоксическим действием. Могут ли нарушения работы печени/продукты некроза гепатоцитов оказывать влияние на toll-подобные рецепторы?
7. Проникают ли гинзенозиды и рифампицин через гематоэнцефалический барьер? Изучалось ли в данной работе биораспределение вышеуказанных соединений в отделах головного мозга крыс?

#### **Замечания**

1. В диссертации не представлены хроматограммы и масс-спектры гинзенозидов, выделенных из суспензионной культуры клеток женьшеня японского.
2. На Рис. 10 (стр. 40) представлена не общая структурная формула гинзенозидов, а только их агликон.
3. Формулировка задачи 1 практически полностью совпадает с целью диссертационной работы.
4. В работе не указана масса тотальной мРНК (из расчета на один образец), которая использовалась для реакции обратной транскрипции и масса кДНК (из расчета на один образец), которая использовалась для ПЦР в режиме реального времени.
5. Использование *U*-теста в ситуации множественных сравнений является некорректным способом статистического анализа.
6. Открытым остаётся вопрос о численности использованных для экспериментов животных. Автором заявлены 12 групп по 10 особей в каждой, в тексте работы встречаются группы по 8 и 9 крыс.
7. В главе 2 содержатся противоречащие друг другу утверждения о свободном доступе всех животных к пище и воде, а также о доступе только к 20% раствору этанола у части животных.
8. В диссертационной работе выявлено большое количество опечаток.



Перечисленные выше вопросы и замечания существенно не влияют на основные выводы и защищаемые положения диссертации.

#### **Рекомендации о практическом применении результатов диссертационного исследования**

Полученные результаты диссертационного исследования могут быть использованы в разработке подходов фармакологической коррекции нейровоспаления в исследованных структурах головного мозга при длительном воздействии этанола посредством воздействия на систему toll-подобных рецепторов.

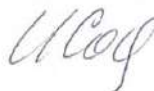
#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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 на основании выполненных автором исследований решена научная задача по изучению роли toll-подобных рецепторов в развитии нейровоспаления в структурах головного мозга крыс при длительном воздействии этанола.

Таким образом, по своей актуальности, научной новизне, практической значимости и достоверности полученных результатов, а также объему и уровню проведенного исследования диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», от 24.09.2013 г., № 842 (с изменениями от 25.01.2024 г., № 62) утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени, а её автор Ереско Сергей Олегович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.4.Биохимия и 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология.

Отзыв обсужден и одобрен на совместном заседании кафедры общей и биоорганической химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, и лаборатории фармакологии поведения Института фармакологии им. А.В. Вальдмана ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, протокол № 04 от 14 ноября 2024 года.

Доцент кафедры биологической  
химии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ  
им. акад. И.П. Павлова»  
Минздрава России  
кандидат биологических наук, доцент



И.Л. Соловцова

Заведующий лабораторией фармакологии  
поведения Института фармакологии  
им. А.В. Вальдмана ФГБОУ ВО  
«ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова»  
Минздрава России  
доктор медицинских наук



Подпись руки заверяю: *Соловцова И.Л.*  
Специалист по кадрам  
И.А. Пищелёва  
14 11 2024 г.



И.М. Суханов

197022, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8,  
тел. 8(812) 338-78-95, e-mail: info@1spbgnu.ru; https://www.1spbgnu.ru/ru/



Подпись руки заверяю: *И.М. Суханов*  
Специалист по кадрам  
Е.В. Руденко  
14 11 2024 г.