

ОТЗЫВ

официального оппонента

заведующей лабораторией генетического моделирования нейродегенеративных процессов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт физиологически активных веществ РАН д.м.н., проф. **Нинкиной Н.Н.**
на диссертацию **Шагиахметова Фариды Шамилевича**
на тему «Нарушение экспрессии генов опиоидной системы мозга в патогенезе
экспериментальной алкогольной зависимости»
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 —
патологическая физиология

Актуальность темы исследования. Злоупотребление алкоголем представляет серьёзную медицинскую и социальную проблему. К сожалению, эффективность терапии уже сформированной алкогольной зависимости на сегодняшний день крайне низка, что связано, в первую очередь, с широким спектром нейрхимических, нейроиммунологических, молекулярно-генетических нарушений, лежащих в основе сформированной зависимости, и, следовательно, трудностями определения конкретных мишеней фармакотерапии заболевания. Поэтому очевидна важность выяснения патогенетических механизмов алкогольной зависимости на ранних этапах ее становления. Диссертационное исследование Шагиахметова Ф.Ш. посвящено разработке этой актуальной проблемы. В основе работы Ф.Ш. Шагиахметова лежит гипотеза о возможном нарушении регуляции экспрессии генов, кодирующих опиатные рецепторы и опиоидные пептиды - предшественники их эндогенных лигандов, в структурах мезолимбической системы мозга животных, демонстрирующих рост добровольного потребления алкоголя на этапах, предшествующих формированию зависимости. Влияние алкоголя на транскрипционную активность генов, кодирующих ключевые белки мозга, в том числе опиатные рецепторы и их лиганды - пептидные модуляторы функций ЦНС, на сегодняшний день мало изучено. В связи с этим диссертационное исследование Шагиахметова Ф.Ш., безусловно, представляется актуальным как в теоретическом, так и в практическом, медико-социальном отношении.

Научная новизна работы. В диссертационном исследовании Шагиахметова Ф.Ш. впервые проведен сравнительный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих все четыре типа опиоидных рецепторов и их эндогенные лиганды, в двух группах крыс – со стабильно низким и растущим уровнем добровольного потребления алкоголя. На основании полученных данных впервые сформулировано положение о том, что низкий уровень экспрессии генов каппа-опиоидных (KOP) и ноцицептиновых (NOP) рецепторов и их эндогенных лигандов может являться одним из ключевых патогенетических факторов, определяющих рост добровольного потребления алкоголя. В работе впервые показано, что у животных с растущим потреблением алкоголя снижена экспрессия гена дофаминового D1 рецептора в стриатуме и повышена экспрессия гена кортикотропин-релизинг-фактора (CRF) в миндалинах, что может иметь принципиальное значение

для дальнейшего изучения сложного комплекса нарушений транскрипционной активности генов, лежащих в основе неконтролируемого роста потребления алкоголя.

Практическая и теоретическая значимость. Теоретическая значимость исследования связана с выявлением однонаправленного характера изменений экспрессии генов динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем у животных в модели экспериментальной алкогольной зависимости. Низкий уровень экспрессии генов динорфин/КОР-рецепторной и ноцицептин/NOR-рецепторной систем, наряду с низким уровнем экспрессии гена дофаминового D1 рецептора и высокой экспрессией гена CRF в миндалине выступают в качестве патогенетического механизма, определяющего рост алкогольной мотивации. Их изучение в качестве единого механизма регуляции мезолимбической системы «награды» и поиск путей сочетанного воздействия на КОР и NOR рецепторы могут представлять перспективное новое направление при разработке высокоэффективных лекарственных средств лечения алкогольной зависимости.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений диссертации. Достоверность представленных в работе данных не вызывает сомнения. Для выяснения нарушений экспрессии генов был использован высокоточный метод количественного определения уровня мРНК, основанный на полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Такой подход позволил автору связать описанный поведенческий фенотип с нарушением экспрессии генов опиоидных рецепторов и предшественников их эндогенных лигандов. Используемые в работе методы являются современными и воспроизводимыми. При обработке и анализе полученных данных применены адекватные статистические методы. На основании полученных результатов автор сделал обоснованные выводы, соответствующие поставленным цели и задачам. Материалы диссертации в полной мере представлены в печатных работах, соответствующих Перечню ВАК и в сборниках докладов научных конференций. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения диссертации.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности и оформления. Диссертационное исследование Шагиахметова Ф.Ш. построено по традиционному плану и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», «Результатов работы и их обсуждения», «Заключения», «Выводов» и «Списка литературы». Работа изложена на 144 страницах, содержит 21 рисунок и 5 таблиц. Список литературы включает 361 публикацию.

Во введении автор дает ясное обоснование актуальности темы диссертации и выбора цели и объектов исследования. Обзор литературы написан хорошим языком и включает в себя современные данные по изучаемой проблеме. Хочется отметить подраздел, в котором автор обсуждает работы с использованием инбредных линий грызунов для изучения генетических основ

алкогольной болезни. Обсуждая известные нейрохимические механизмы действия алкоголя, Ф.Ш. Шагиахметов дает краткую критическую оценку существующим на сегодня гипотезам. В этот раздел автор также включил подразделы: *1.2.4 Влияние алкоголя на транскрипционные факторы* и *1.2.5 Эпигенетические эффекты алкоголя*. Мне представляется, что было бы уместнее выделить их в самостоятельный раздел, посвященный молекулярно-генетическим механизмам действия алкоголя. Нельзя не отметить, что эти области наименее исследованы в настоящее время, а имеющиеся в литературе данные весьма противоречивы. Обосновывая выбор генов опиатной системы мозга для анализа их транскрипционной активности у животных с ростом алкогольного предпочтения, автор подробно описывает строение и функции этой системы мозга, а также устоявшиеся представления о ее роли в механизмах зависимости от психоактивных веществ. Таким образом, можно заключить, что обзор литературы дает ясное представление о современном состоянии научной проблемы, хорошо проиллюстрирован, материал грамотно изложен.

Анализ литературных данных позволил автору выделить наиболее противоречивые и недостаточно изученные вопросы о роли различных звеньев опиоидной системы мозга в регуляции алкогольного предпочтения и четко обосновать цели и задачи собственного диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы исследования» представлена схема эксперимента, дано подробное описание методологии изучения экспрессии исследуемых генов, описаны методы статистической обработки результатов. Для изучения экспрессии генов в работе использован трехступенчатый метод – выделение тотальной РНК из структур мозга, обратная транскрипция и последующая количественная ПЦР в реальном времени (RT-qPCR). Выбор этого подхода автором абсолютно оправдан. RT-qPCR - современный чувствительный метод, который в настоящее время широко используется для количественной оценки экспрессии генов. Все этапы генетического анализа подробнейшим образом описаны в работе. Очень важно, что на всех этапах проводился тщательный контроль качества выделяемых нуклеиновых кислот и специфичности продуктов амплификации. Критическим моментом является нормализация результатов с использованием референсного гена, что имеет важнейшее значение для минимизации различий в процессе приготовления образцов. В данном исследовании в качестве референсного был использован ген β -актина. Действительно, именно этот ген используется наиболее часто при изучении экспрессии генов в мозге наряду с генами 18S рРНК (18S), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), β -тубулина и др. Хотелось бы уточнить, с чем связан выбор именно гена β -актина в качестве референсного в данном исследовании? В целом, глава «Материалы и методы» хорошо иллюстрирована, что вместе с подробным описанием всех этапов эксперимента, делает работу легко воспроизводимой.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 4-х разделов. В первом разделе представлено количественное сопоставление уровня мРНК опиоидных рецепторов и предшественников их эндогенных лигандов в областях мезолимбической системы у интактных крыс. Это очень важная часть работы, результаты которой послужили основой для дальнейшего анализа экспрессии в мозге хронически алкоголизованных животных. Действительно, целостная картина транскрипционной активности генов опиоидной системы в настоящее время в литературе практически не представлена. Важной задачей автора была оценка соответствия распределения мРНК и плотности рецепторов согласно имеющимся литературным данным [Bazov et al., 2018 и др.]. Полученные в этом разделе результаты послужили основой для формулирования первого вывода: показана региональная специфичность экспрессии генов опиоидных пептидов и их рецепторов в структурах мезолимбической системы мозга: у интактных животных наиболее высокий уровень экспрессии мРНК мю- (MOR) и дельта- (DOR) опиоидных рецепторов детектировался в стриатуме, каппа- (KOR) – в среднем мозге, ноцицептинового (NOP) – в миндалине. Максимальный уровень мРНК продинорфина (pDyn) выявлен в миндалине, проноцицептина (pNoc) – в среднем мозге. Таким образом, впервые была дана количественная сравнительная оценка экспрессии изучаемых генов в ключевых областях мезолимбической системы мозга крыс.

Второй раздел посвящён оценке алкогольной мотивации животных с использованием модели «свободный выбор» между 10% этанолом и водой. Задачей этого этапа исследования было формирование групп животных с одинаковым изначальным уровнем предпочтения алкоголя, но с различной динамикой его потребления во времени. Показано, что крысы с изначально низким уровнем предпочтения алкоголя в процессе его добровольного потребления разделяются на две группы: первая группа животных сохраняет низкий уровень потребления алкоголя (A^-), вторая группа крыс увеличивает его потребление более чем в два раза (A^+). Полученные в этом разделе результаты послужили основой для формулирования второго вывода.

Во третьем разделе представлены результаты анализа экспрессии генов опиоидной системы: у животных группы A^+ обнаружен достоверно более низкий, по сравнению с животными группы A^- , уровень экспрессии мРНК продинорфина (pDyn) и проноцицептина (pNoc) в вентральном стриатуме, причем уровень мРНК продинорфина отрицательно коррелировал с уровнем потребления алкоголя; животные группы A^+ характеризовались достоверно более низким уровнем мРНК KOR, NOP рецепторов и продинорфина в миндалине мозга. При этом уровень мРНК KOR и NOP рецепторов отрицательно коррелировал с уровнем потребления алкоголя. Эти результаты послужили основой для в 3-го, 4-го и 6-го выводов диссертации. Все полученные в этой части работы данные являются приоритетными.

Большой интерес представляет следующий раздел работы. Так как экспрессия продинорфина сопряжена с активацией D1 рецепторов в стриатуме, была исследована экспрессия мРНК D1 в этой структуре. У крыс группы A⁺ экспрессия мРНК D1 рецептора была достоверно ниже, чем у животных группы A⁻, что согласуется с наблюдаемым низким локальным уровнем мРНК продинорфина, причем уровень мРНК D1 рецептора отрицательно коррелировал с уровнем потребления алкоголя. Результаты отражены в 5-м выводе диссертации. Учитывая взаимосвязь между каппа-опиоидной, ноцицептивной системами и кортикотропин-релизинг фактором (CRF) в миндалине мозга, автор исследовал уровень мРНК CRF и CRF1 рецептора в данной структуре. В работе показано, что уровень мРНК CRF в миндалине мозга в группе A⁺ в 5,5 раз выше по сравнению с животными группой A⁻, что согласуется с современными представлениями о реципрокных отношениях этих систем в этой структуре мозга. Большой интерес представляет выявленная автором положительная корреляция между экспрессией мРНК CRF и уровнем потребления алкоголя в группе A⁺, подтверждающая, что высокий уровень CRF может являться еще одним важным фактором, определяющим рост мотивации потребления алкоголя. Эти данные отражены в 7-м выводе.

Полученные Шагиахметовым Ф.Ш. данные представляются приоритетными и перспективными в плане дальнейших исследований, включая определение возможных молекулярных механизмов нарушения экспрессии генов опиоидной системы, в том числе, статуса метилирования промоторных участков этих генов.

Текст диссертационной работы Шагиахметова Ф.Ш. завершается разделом «Заключение», в котором автор обсуждает и обобщает полученные результаты. На основании проведенной работы автором сделаны четкие и обоснованные выводы, которые полностью соответствуют поставленным задачам.

Полученные в работе данные и сделанные на их основании выводы свидетельствуют о том, что диссертационное исследование Шагиахметова Ф.Ш. расширяет представление о патогенетических механизмах алкогольной болезни и, несомненно, представляет как фундаментальный, так и практический интерес для патологической физиологии и биомедицинских наук в целом. Полученные данные открывают перспективы использования каппа- и ноцицептивных рецепторов в качестве новых мишеней фармакотерапии алкоголизма на его ранних стадиях.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов. Основные положения диссертации опубликованы в научной печати, доложены и обсуждены на конференциях и конгрессах. Данные опубликованы в 7 печатных работах, включая 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в рецензируемом журнале, входящем в список Web of Science, и 3 тезисов докладов на конференциях. Публикации соответствуют содержанию

экспериментальной части работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации. Автореферат полностью отражает основное содержание работы. В нем отражены актуальность темы, научная новизна, практическая значимость, основные результаты и их обсуждение.

Замечания. Существенных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет. Вопросы к диссертанту носят дискуссионный характер и сформулированы в тексте Отзыва. Можно лишь отметить отдельные стилистические и редакционные недоработки, ни в коей мере не снижающие качества и ценности диссертации.

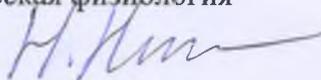
Заключение. Диссертация Шагиахметова Фариды Шамилевича на тему «Нарушение экспрессии генов опиоидной системы мозга в патогенезе экспериментальной алкогольной зависимости», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - Патологическая физиология, является законченным научным исследованием. Диссертационная работа Шагиахметова Ф.Ш. является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием. По актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденным постановлением правительства РФ от 24.09.13 номер 842 (в редакции постановления Российской Федерации N 1168 от 01.10.2018, с изменениями от 26.05.2020), а ее автор, Шагиахметов Фарид Шамилевич, заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 - Патологическая физиология.

Официальный оппонент:

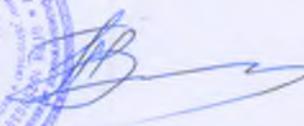
Доктор медицинских наук, заведующая лабораторией
генетического моделирования нейродегенеративных процессов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт физиологически активных веществ
Российской академии наук
142432, Московская обл., Черноголовка, Северный проезд, дом 1
Телефон 8(496) 524 9508
e-mail: ninkina@ipac.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 14.03.03 - Патологическая физиология

Нинкина Наталья Николаевна



Подпись Н.Н. Нинкиной заверяю
Ученый секретарь ИФВ РАН
кандидат химических наук



Т.Н. Великохатко

« 03 » ноября 2020 г.