

На правах рукописи

ОСЕЧКИНА
Наталья Сергеевна

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ТЯЖЕСТИ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ
НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА

14.03.04 – токсикология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт–Петербург

2020

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России)

**Научный
руководитель:**

Назаров Георгий Валерьевич
доктор химических наук, доцент, главный научный сотрудник Федерального государственного унитарного предприятия «Научный центр «Сигнал»

**Официальные
оппоненты:**

Глотов Андрей Сергеевич
доктор биологических наук, руководитель отдела геномной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

Сычева Людмила Петровна
доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» ФМБА России

**Ведущая
организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН)

Защита диссертации состоится «16» марта 2021 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.030.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства».

Автореферат разослан « ____ » _____ 202_ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор



Луковникова Любовь Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия наиболее распространенной причиной экзогенных интоксикаций являются нейротропные яды – вещества, которые способны изменять возбудимость и функции центральной нервной системы (ЦНС) [Башарин В.А., 2011; Остапенко Ю.Н. и др., 2008; Акалаев Р.Н. и др., 2017; Петров А.Н., 2007]. К числу данных агентов относится широкий круг токсичных веществ, таких как наркотики, транквилизаторы, снотворные средства, нейролептики, психостимуляторы, фосфорорганические пестициды и многие другие, включая спирт этиловый и его суррогаты.

На сегодняшний день среди причин, вызывающих преждевременную смерть людей, острые алкогольные отравления и алкоголизм занимают ведущее место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [Долгополова Т.В., Куташов В.А., 2015; Гришин В.А., 2011]. Большое количество тяжелых исходов при отравлении этанолом, значительное ухудшение клинических проявлений поражения мозга, сохраняющаяся высокая летальность свидетельствуют о сложности диагностики и прогнозирования степени воздействия этанола на организм.

В ряде исследований описывается, что прямые и опосредованные токсические эффекты этанола объясняются его физико-химическими свойствами. Малая диссоциация и слабая поляризация небольших молекул этанола позволяют веществу легко проникать через биологические мембраны [Бонитенко Е.Ю., Нечипоренко С.П., 2010; Долго-Сабуров В.Б. и др., 2010]. Помимо поражения плазматических мембран клеток, этиловый спирт оказывает действие на белки клеточных мембран – рецепторы. К числу таких мембранных белков, относится ионотропный ГАМК_A-рецептор – компонент ГАМК-ергической тормозной нейромедиаторной системы.

В литературе широко обсуждается существенная роль генетических факторов, в частности уровня экспрессии и полиморфизма генов ГАМК_A-рецептора в формировании толерантности ЦНС к воздействию этанола как у крыс, так и человека [Табакофф Б., 2003]. В тоже время точные механизмы, наследственные факторы зависимости степени тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему от генетических особенностей ГАМК_A-рецептора пока остаются малоизученными и непонятыми.

Недостаточное количество информации по данной проблеме, а также ее медико-социальная значимость диктуют необходимость создания лечебно-профилактических мероприятий, учитывающих генетические особенности организма при отравлениях этанолом.

Новые подходы к разработке прогностических диагностических маркеров, определяющих глубину депримирующего действия этанола, могут быть связаны с выявлением полиморфизмов генов ГАМК_A-рецептора, а также установлением связи между уровнем их экспрессии и активностью ГАМК_A рецепторного комплекса. Комплексное изучение фенотипа и генотипического профиля консультируемого лица позволит с высокой степенью вероятности оценить риск

развития у него тяжелых форм депримирующего действия этанола, выявить признаки интоксикации на раннем этапе, а также дать предварительный прогноз характера течения отравления. Создание эффективного методического аппарата, включающего в себя учет генетических маркеров, определяющих тяжесть течения интоксикации, существенно повысит точность диагностики состояния отравленных.

Вышеизложенные обстоятельства обуславливают актуальность установления молекулярно-генетических маркеров ГАМК_A-рецептора (полиморфизма генов, кодирующих ГАМК_A-рецептор, и уровня их экспрессии), которые определяют степень тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему организма при интоксикации.

Степень разработанности темы диссертационного исследования. Формирование восприимчивости к депримирующему действию этанола, склонность к развитию алкоголизма зависят не только от дозы, путей поступления алкоголя, но и от генетических факторов – полиморфизмов соответствующих генов и уровня их экспрессии [Edenberg H.G., 2013]. В некоторых исследованиях показана взаимосвязь полиморфизмов генов ГАМК_A-рецепторов с предрасположенностью к алкогольной зависимости у человека [Herman M.A., 2013]. Достоверные результаты получены для генов, кодирующих α_1 -, α_2 -, α_6 - и γ_2 -субъединицы ГАМК_A-рецептора человека (*GABRA1*, *GABRA2*, *GABRA6*, *GABRG2*) [Востриков В.В., 2004; Li D., 2014]. Дополнительным критерием прогноза исхода интоксикации могут являться показатели экспрессии генов. Так на модели животных был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих соответствующие субъединицы ГАМК_A-рецептора, на фоне однократного и хронического употребления этанола. Для генов, кодирующих α_1 - и α_4 - субъединицы ГАМК_A-рецептора крыс (*Gabra1* и *Gabra4*), было обнаружено, что при многократном воздействии этанола на крыс в коре большого мозга происходит снижение уровня мРНК для α_1 -субъединицы и увеличение уровня мРНК для α_4 -субъединицы [Pignataro L., 2009; Davies M., 2003]. Информация о связи полиморфизмов генов ГАМК_A-рецептора и уровня их экспрессии со степенью угнетения функций ЦНС (после интоксикации этанолом) практически отсутствует. Не изучено возможное использование наследственных особенностей ГАМК_A-рецептора в качестве маркеров, определяющих тяжесть депримирующего действия этанола. Всё указанное позволило сформулировать цель и задачи настоящего исследования.

Целью настоящего исследования является экспериментальное установление генетических маркеров ГАМК_A-рецептора, которые определяют глубину депримирующего действия этанола, при острой и хронической интоксикации этанолом на моделях лабораторных животных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести анализ научных данных, связанных с изучением генетических особенностей ГАМК_A-рецептора, определяющих различие эффектов

воздействия этанола на организм, для выявления перечня генов-кандидатов, влияющих на степень тяжести депримирующего действия этанола.

2. Изучить влияние острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов ГАМК_A-рецептора в образцах тканей экспериментальных животных.

3. Оценить особенности влияния уровня экспрессии генов ГАМК_A-рецептора на степень тяжести депримирующего действия этанола после острой интоксикации крыс без предшествующей алкоголизации и на модели предварительно алкоголизированных крыс.

4. Выявить полиморфные локусы генов ГАМК_A-рецептора, которые могут определять глубину депримации после острого отравления этанолом и изучить их влияние на уровень экспрессии генов ГАМК_A-рецептора.

5. Установить связь между полиморфизмом генов и глубиной тяжести угнетения ЦНС на модели острой интоксикации этанолом крыс и выявить полиморфные маркеры ГАМК_A-рецептора, которые могут быть использованы для определения степени тяжести интоксикации этанолом.

Научная новизна исследования. Исследовано влияние острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов, кодирующих α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_4 -, α_5 -, α_6 - и β_1 -субъединицы ГАМК_A-рецептора крыс (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1*) в различных органах и крови лабораторных животных. 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 уровня экспрессии (УЭ) генов *Gabra5* и *Gabrb1* в головном мозге предварительно алкоголизированных крыс. Показано, что после хронической алкоголизации этанолом происходит достоверное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс.

Впервые получены данные о связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. 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*.

Выявлено генетическое разнообразие аллельных вариантов для 11 полиморфизмов: *Gabra1* (rs107127945, rs197587817); *Gabra2* (rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638); *Gabrb1* (rs13456854, rs13456852, rs13456851); *Gabra3* (rs105096249); *Gabra4* (rs197596713).

Обнаружено, что полиморфные локусы генов *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabrb1* определяют уровень их экспрессии:

– полиморфизмы rs8168342, rs198286814, rs198837638 гена *Gabra2* и полиморфизмы rs13456854, rs13456852 и rs13456851 гена *Gabrb1* определяют уровень экспрессии гена в головном мозге интактных крыс;

– полиморфизмы rs13456854, rs13456852, rs13456851 гена *Gabrb1* определяют уровень экспрессии гена в головном мозге предварительно алкоголизованных крыс;

– полиморфизмы rs107127945 и rs197587817 гена *Gabra1* определяют уровень экспрессии гена в головном мозге предварительно алкоголизованных животных после острого отравления этанолом.

Впервые установлена ассоциация степени интоксикации крыс, перенесших острое отравление этанолом, с генотипом С/Т по гену *Gabra2* полиморфного локуса rs105733011. Показано, что наличие у крыс гетерозиготного генотипа С/Т по гену *Gabra2* определяет «тяжелую степень интоксикации» спустя 8 часов после острого отравления этанолом.

На модели предварительно алкоголизованных крыс выявлены факторы повышенного риска гибели крыс при отравлении этанолом: генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипы Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4* (спустя 8 часов).

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования вносят дополнения в имеющиеся представления о патогенетических изменениях в ГАМК-ергической системе, обусловленных однократным или длительным воздействием этанола, и дают представления о влиянии некоторых молекулярно-генетических особенностей ГАМК_A-рецептора на степень тяжести депримирующего действия токсиканта на нервную систему.

Выявленные закономерности изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, под влиянием острого и хронического воздействия этанолом позволили расширить теоретические представления о депримирующем действии токсиканта на ГАМК-ергическую нейромедиаторную систему. Полученные данные о связи уровня экспрессии исследуемых генов со степенью тяжести депримирующего воздействия этанола на нервную систему крыс как на фоне предварительной алкоголизации, так и без нее свидетельствуют о целесообразности использования наследственных факторов ГАМК_A-рецептора для определения различных отклонений нервной системы, которые возникают при интоксикации этанолом. Установлено распределение частот генотипов изучаемых полиморфизмов и выявлено влияние некоторых аллельных вариантов на уровень экспрессии соответствующих генов у интактных крыс, а также предварительно алкоголизованных животных на фоне острого отравления этанолом и без него.

Выявленные маркеры ГАМК_A-рецептора, определяющие степень интоксикации крыс, перенесших острое отравление этанолом, и факторы повышенного риска гибели предварительно алкоголизованных крыс при отравлении этанолом используются в практической научно-исследовательской деятельности

ФГБУН ИТ ФМБА России при проведении работ по оценке тяжести неврологических нарушений после отравления этанолом, а также внедрены в практику работы лабораторий научно-исследовательских организаций ФМБА

Методология и методы исследования. Методология исследования состояла в проведении острого алкогольного отравления (на фоне предварительной алкоголизации животных и без нее), с последующим определением состояния животных и установлением возможных молекулярно-генетических маркеров тяжести интоксикации крыс. С использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) проводили исследование полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1* и определение их уровней экспрессии. С использованием комплекса статистических методик проводили установление ассоциации генотипов животных и уровня экспрессии генов со степенью угнетения функционирования ЦНС, а также определяли динамику изменения уровней экспрессии генов после острой интоксикации крыс.

Положения, выносимые на защиту:

1. Острое отравление этанолом приводит к увеличению экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabrb1* и *Gabra5*, *Gabrb1* в головном мозге крыс, перенесших острое отравление этанолом без предшествующей алкоголизации, и предварительно алкоголизованных животных, соответственно, что влияет на степень выраженности депримирующего действия этанола, при этом утяжеление клиники интоксикации связано со снижением уровней экспрессии генов *Gabra2*, *Gabrb1* и *Gabra4* у крыс, перенесших острое отравление этанолом без предшествующей алкоголизации, и предварительно алкоголизованных крыс, соответственно.

2. Полиморфный локус rs105733011 гена *Gabra2* определяет степень интоксикации этанолом спустя 8 часов после отравления крыс в дозе 0,8 ЛД₅₀; полиморфные локусы rs10509624 гена *Gabra3* и rs197596713 гена *Gabra4* определяют повышенный риск гибели предварительно алкоголизованных крыс спустя 3 и 8 часов, соответственно, после отравления этанолом в дозе 0,8 ЛД₅₀.

3. Генотип С/Т (rs105733011) по гену *Gabra2* у крыс, перенесших острое отравление этанолом, а также генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3* и генотипы Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4* у крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации, являются маркерами, которые применимы для определения глубины тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством экспериментальных животных и формированием групп сравнения и контроля; использованием современных высокоинформативных молекулярно-генетических лабораторных методов исследования; адекватными поведенческими и токсикологическими моделями и методами исследования, применением высокотехнологичного

сертифицированного оборудования для изучения генетических особенностей; применением адекватных методов статистической обработки полученных данных.

Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены 11 марта 2019 г. на Ученом Совете ФГБУН ИТ ФМБА России. Материалы были представлены и обсуждены на Всероссийской научной конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (Санкт-Петербург, 2013), Научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии» (Санкт-Петербург, 2019). Основные научные результаты диссертации опубликованы в периодических изданиях, в том числе 7 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личный вклад автора. Диссертантом на основе лично проведенного теоретического анализа информации по рассматриваемой теме определена цель и содержание работы, выполнены лабораторно-инструментальные исследования, проанализированы результаты исследования, сформулированы выводы и положения, выносимые на защиту.

Связь темы диссертации с плановой тематикой научно-исследовательской работы учреждения. Работа 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 Федеральную целевую программу «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации».

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 173 страницах и иллюстрированы 26 таблицами и 31 рисунком. Библиография содержит 208 источников, из них 100 отечественных и 108 зарубежных авторов. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, словаря терминов, а также списка использованных источников литературы и приложения.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 7 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **ВВЕДЕНИИ** отражена актуальность темы, поставлена цель и сформулированы задачи, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также степень достоверности и апробация результатов.

В **ГЛАВЕ 1** проведен анализ данных литературы об основных типах эффектов и поражений, которые возникают при острой и хронической интоксикации. Также рассмотрены существующие данные особенностей метаболизма

и

токсичности этанола в организме человека и лабораторных животных в зависимости от генетических факторов, определяющих активность определенных ферментативных систем и нейрорегуляторных рецепторов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования выполнены на 155 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область). Животные содержались в соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Для моделирования интоксикации использовали этанол. Острое отравление этанолом у животных (на фоне предварительной алкоголизации и без нее) вызывали внутрибрюшинным введением 33% раствора этилового спирта (этанола) в дозе, равной 0,8 ЛД₅₀. Предварительную алкоголизацию животных проводили в течение 1 месяца путём ежедневного внутрижелудочного введения 40% раствора спирта этилового в дозе 5 г/кг (2 недели) и 7 г/кг (2 недели) [Петров А.Н., 2013].

В серии экспериментов по изучению влияния острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов-кандидатов (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrbr1*) использовали группы животных, приведенные в таблице 1.

Таблица 1 – Наименование экспериментальных групп животных

Наименование группы (количество животных)	Описание группы
Группа № 1	Интактные крысы (образцы крови и тканей отбирались без введения этанола)
Группа № 2	Крысы, подвергшиеся острому воздействию этанола (образцы крови и тканей отбирались спустя 8 часов после острого отравления этанолом в дозе 0,8 ЛД ₅₀)
Группа № 3	Крысы, подвергшиеся хроническому воздействию этанола в течение одного месяца
Группа № 4	Крысы, подвергшиеся острой алкогольной интоксикации на фоне хронического воздействия этанола в течение одного месяца (образцы крови и тканей отбирались спустя 8 часов после острого отравления этанолом в дозе 0,8 ЛД ₅₀)

У животных каждой группы были отобраны образцы крови, головного мозга и печени, из которых были выделены образцы РНК. Определение уровней экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, проводили в крови, а также в тех органах (головной мозг и печень), изменения в которых играют определяющую роль в патогенезе алкогольной болезни [Виницкая А. Г., 2009]. Кровь использовали как наиболее доступный биологический материал для экспериментальной диагностики.

Среди множества отделов головного мозга для исследования был выбран гиппокамп, важную роль в регуляции возбудимости которого играет тормозная ГАМК-ергическая система. Кроме того, отмечается, что именно этот отдел мозга вовлечен в формирование толерантности к воздействию алкоголя, а также играет

центральную роль в формировании памяти [Epoch M. A., 2012].

С использованием метода обратной транскрипции из образцов выделенной РНК были получены образцы кДНК. Полученные образцы кДНК использовали в качестве матрицы для количественного метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), с помощью которого проводили определение уровня экспрессии генов.

Уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*, *Gabrb1* оценивали путем измерения уровня мРНК для каждого гена индивидуально по каждому животному с использованием значений флюоресценции продуктов количественной ПЦР-РВ путем подсчета числа циклов ПЦР, необходимых для достижения заданного уровня пороговой флюоресценции.

Полученные результаты представляли в виде относительного уровня (относительно гена *18s pPНК*, уровень экспрессии которого принимали за 100%) экспрессии (УЭ, %) исследуемых генов.

Показатель уровня экспрессии гена определяли относительно гена-рефери (эндогенного контроля) по следующей формуле:

$$УЭ = \frac{\text{количество мРНК определяемого гена}}{\text{количество мРНК гена-рефери}} * 100\% \text{ [Мисюрин В.А., 2014].}$$

Для сравнения уровней экспрессии генов УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* в группах использовали непараметрический критерий Крускала-Уоллиса или U-тест Манна Уитни. Множественное сравнение показателей проводили с применением критерия Данна. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$ для каждого из критериев [Гланц С., 1998]. На основании сравнения показателей УЭ у четырех экспериментальных групп оценивали влияние острого и длительного воздействия этанола на экспрессию генов-кандидатов.

Далее проводили выявление связи рассчитанных значений УЭ генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола у крыс (на фоне предшествующей алкоголизации и без нее) спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Далее у теоретически выбранных полиморфизмов изучали их распределение в исследуемой популяции крыс и обосновывали замены, которые могут определять глубину депримации при интоксикации этанолом. Для этого до острого воздействия

этанолом у исследуемых крыс отбирали образцы крови, выделяли ДНК и проводили генотипирование с использованием метода ПЦР-РВ. После проведения генотипирования экспериментальных животных изучали влияние выявленных генотипов на уровень экспрессии генов.

На заключительном этапе экспериментальных исследований определяли ассоциацию исследуемых полиморфизмов с тяжестью депримирующего действия этанола на нервную систему животных после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀. Для этого у крыс спустя 3 ч (по достижению глубокого угнетения ЦНС) и 8 ч (по достижению физиологической нормы ЦНС) после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀ проводили оценку состояния экспериментальных животных с

использованием алгоритма, основанного на расчете показателя индекса тяжести неврологических нарушений (ИТНН) [Башарин В.А., 2011]. ИТНН в баллах отражал состояние экспериментальных животных, соответствующее степени острой алкогольной интоксикации у человека (таблица 2).

Таблица 2 – Оценка физиологического состояния экспериментальных животных на основании балльной системы ИТНН

Состояние животных	Физиологическое состояние экспериментальных животных	Значение ИТНН, балл
1	Уровень физиологической нормы	≥ 55
2	Оглушение	от 46 до 55
3	Сопор	от 36 до 45
4	Кома поверхностная	от 26 до 35
5	Кома глубокая	от 18 до 25
6	Кома терминальная	≤ 17
7	Летальный исход	-

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА, ПРИ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

3.1. Определение токсикометрического параметра этанола у исследуемых животных

В работе в качестве токсикометрического параметра этанола был выбран один из наиболее широко применяемых показателей опасности ядовитых и умеренно-токсичных веществ – среднесмертельная доза (ЛД₅₀), которая представляет собой наиболее точную количественную характеристику токсичности вещества с минимальным значением 95% доверительного интервала и несомненным оцениваемым эффектом (гибель животного) [Лисицкий Д.С., 2013; Куценко С.А., 2004].

Среднесмертельные дозы определяли в каждой партии полученных для исследования крыс «табличным экспресс-методом» по В.Б. Прозоровскому. Значения среднесмертельных доз (ЛД₅₀) рассчитанные на 1 сутки составили: 6,31±0,49 г/кг и 6,61±0,64 г/кг для двух групп животных, использованных в экспериментах. Для моделирования острой интоксикации этанолом был выбран внутрибрюшинный путь введения 33% этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, составившей для каждой партии 5,1 г/кг и 5,3 г/кг. Это позволило стандартизировать схему введения и уменьшить разброс клинических проявлений интоксикации [Башарин В.А., 2011].

3.2. Экспериментальная оценка выраженности острого отравления этанолом у животных

Осуществляя определение значений ИТНН у крыс (после внутрибрюшинного введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀) на двух этапах: через 3 ч (рисунок 1, А и В) и 8 ч (рисунок 1, Б и Г), нам удалось выявить наличие разных клинических проявлений после острого отравления крыс без предшествующей алкоголизации и на фоне нее.

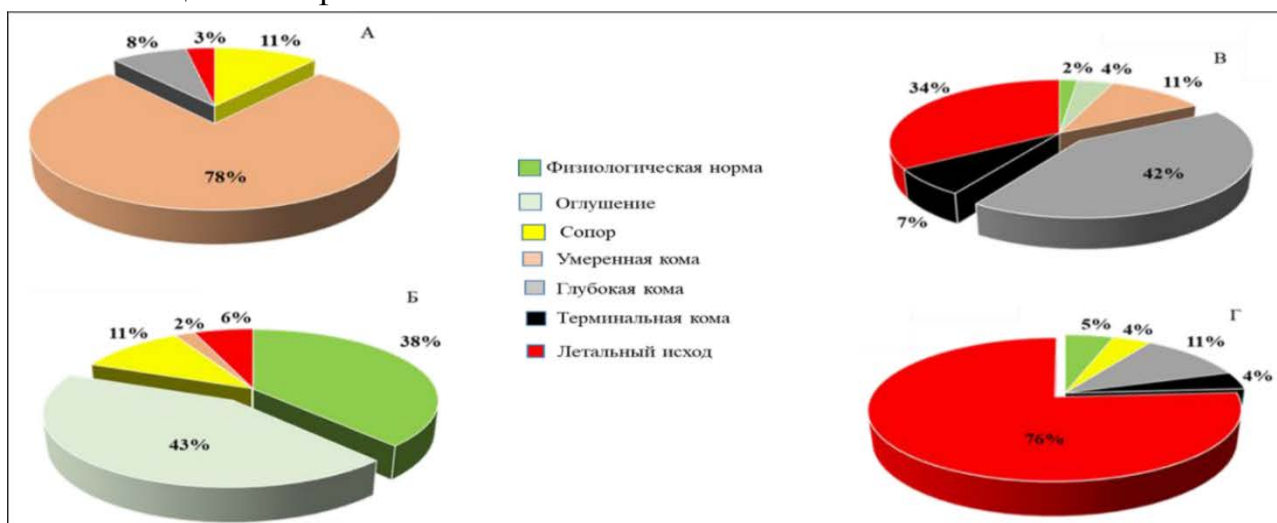


Рисунок 1 – Относительное количество животных, перенесших острое отравление без предварительной алкоголизации (А, Б) и перенесших острое отравление на фоне предварительной алкоголизации (В, Г), характеризующихся разными состояниями спустя 3 и 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, %

Данные, представленные на рисунке 1 демонстрируют, что через 8 часов после острого отравления этанолом у хронически алкоголизированных животных было зарегистрировано большее количество случаев «летального исхода» – 76%, чем у крыс, перенесших острое отравление без предварительной алкоголизации – 6% (рисунок 1, Г и Б, соответственно). Полученные результаты согласовывались с клиническими наблюдениями, выявленными в ряде научных экспериментов [Yin S.J., 2001; Лисицкий Д.С., 2014].

Учитывая полученный вывод, целесообразным являлось изучение и выявление молекулярно-генетических маркеров, которые оказывают влияние на степень тяжести интоксикации этанолом при остром отравлении токсикантом как на фоне предварительной алкоголизации, так и без нее.

3.3. Изучение влияния острой и хронической интоксикации этанолом на профиль (уровень) экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* в образцах тканей лабораторных животных

Учитывая сложную гетероолигомерную структуру ионотропного ГАМК_A-рецептора было решено использовать только те гены, которые кодировали субъединицы, участвующие в формировании основных ответных реакций организма после воздействия на него этанола.

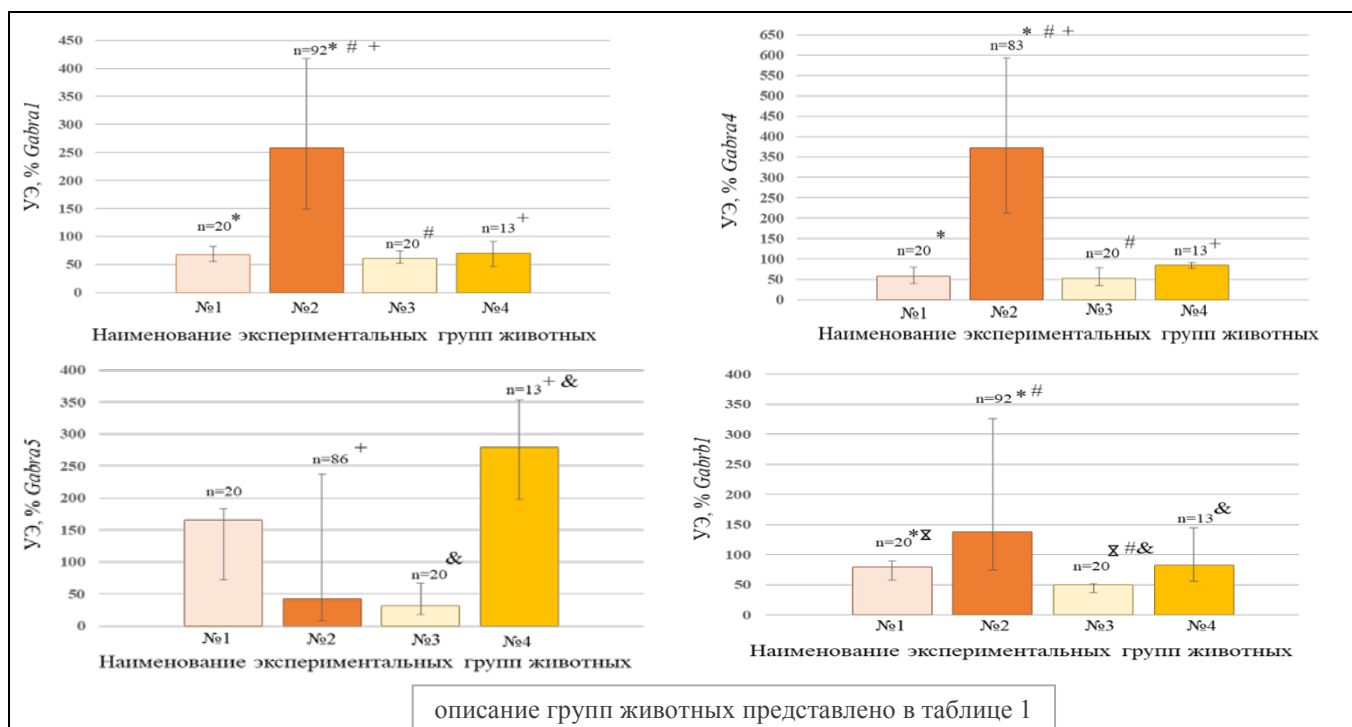
В качестве генов-кандидатов в нашем исследовании использовали гены, кодирующие все типы альфа субъединицы (*Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6*), а также ген *Gabrb1*, кодирующий β₁-субъединицу. Выбор данных генов обусловлен несколькими причинами. Во-первых, из 16 субъединиц,

формирующих множество изоформ рецепторов, альфа субъединицы входят в состав наиболее распространенных и функционально-значимых форм ГАМК_A-рецепторов: $\alpha_1\beta\gamma_2$ -, $\alpha_2\beta\gamma_2$ -, $\alpha_3\beta\gamma_2$ -, $\alpha_4\beta\gamma_2$ -, $\alpha_5\beta\gamma_2$ -, $\alpha_6\beta\gamma_2$ -, $\alpha_4\beta\delta$ -, $\alpha_6\beta\delta$ [Нил, М. Дж., 2018]. Во-вторых, несомненно важным для функционирования ГАМК_A-рецептора является наличие двух альфа и двух бета субъединиц. В-третьих, участие гамма и дельта субъединиц в процессе формирования ответных реакций нервной системы при действии этанола являются мало изученными, тогда как научно обоснованным является влияние мутаций остатков определенных аминокислот в α - или β -субъединицах на проявления токсического процесса, а также на способность этанола усиливать реакции ГАМК [Башарин В. А., 2011; Бонитенко Е. Ю., 2010]. Из трех β -субъединиц (β_1 -, β_2 -, β_3 -), в исследование включается β_1 -субъединица, поскольку для гена, кодирующего ее аминокислотную последовательность, представлено достаточное количество исследований, указывающих на роль гена *Gabrb1* в патогенезе алкоголизма [Dick D. M.; Gozzi A., 2013].

В результате проведенных исследований в образцах крови и печени у всех экспериментальных животных не было выявлено экспрессии изучаемых генов. В тоже время в образцах головного мозга была выявлена экспрессия всех исследуемых генов – *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1*, за исключением гена *Gabra6*. Проведенный анализ полученных результатов позволил выявить, что у крыс значения УЭ варьировались в зависимости от гена и экспериментальной группы. Достоверное ($p < 0,05$) изменение уровней экспрессии генов

было

выявлено для генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* (рисунок 2).



+, *, &, #, X – статистически значимые различия показателя между соответствующими группами животных; n – количество животных в группе

Рисунок 2 – Относительный уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* в головном мозге экспериментальных животных, Ме (25; 75 перцентили)

Результаты, представленные на рисунке 2 демонстрируют, что острое отравление крыс приводило к увеличению экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* – в 3,8, 6,5 и 1,7 раза, соответственно. В то же время было установлено, что острое отравление предварительно алкоголизованных крыс вызывало увеличение УЭ генов *Gabra5* и *Gabrb1* – в 8,7 и 1,7 раза, соответственно. Кроме того, для генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* было обнаружено, что значение уровней экспрессии были выше в головном мозге крыс, перенесших острое отравление по сравнению с животными, употреблявшими этанол в течение 1 месяца. Также повышенные значения УЭ для генов *Gabra1* и *Gabra4* были выявлены в головном мозге крыс, перенесших острое отравление этанолом без предварительной алкоголизации по сравнению с крысами, перенесшими острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации. Для гена *Gabra5* после острого отравления животных (не подвергшихся предшествующей алкоголизации), напротив, установлено меньшее значение УЭ в головном мозге крыс, чем у предварительно алкоголизованных животных. В отношении длительного воздействия этанола регистрировали достоверное снижение (в 1,6 раза) уровня экспрессии гена *Gabrb1*.

Сопоставление изменений уровней экспрессии генов позволило сделать вывод о том, что значимое увеличение УЭ генов *Gabra1*, *Gabra4* и *Gabrb1* вызывает активацию ГАМК_A рецепторного комплекса в ответ на острое отравление этанолом. В тоже время зафиксированное снижение уровня экспрессии гена *Gabrb1* после хронической алкоголизации, вероятно, приводит к ослаблению ГАМК-ергической передачи и общему снижению активности ГАМК-ергической системы при длительном употреблении алкоголя.

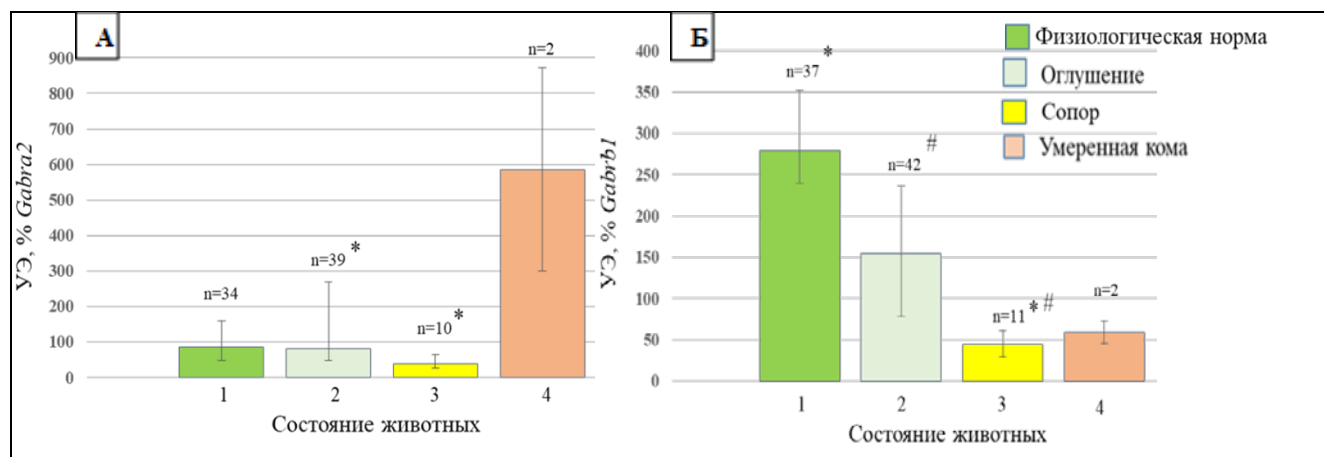
Таким образом, определение относительного уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, имеет несомненное значение при изучении как острой, так и хронической интоксикации этанолом. Полученные результаты могут являться критериями токсического действия этанола, а изменения в УЭ исследуемых генов предположительно лежат в основе формирования разных степеней тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему организма. В связи с этим на следующем этапе нашей работы мы сопоставили уровень экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* со степенью депримирующего действия этанола на организм крыс.

3.4. Выявление связи уровня экспрессии генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, со степенью депримирующего действия этанола

Принимая во внимание выявленное изменение уровней экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5* и *Gabrb1* при остром и хроническом воздействии этанола, представлялось целесообразным исследовать связь

показателей УЭ генов с выраженностью острого отравления этанолом без предварительной алкоголизации животных и на фоне нее.

На модели крыс, перенесших острое отравление этанолом, статистически достоверные различия УЭ генов были установлены для генов *Gabra2* и *Gabrb1* между группами животных, состояние которых характеризовалось разными значениями критерия ИТНН («физиологическая норма»/«оглушение»/«сопор»/«умеренная кома»), спустя 8 часов после воздействия токсикантом (рисунок 3).



*, # – статистически значимые различия показателя между группами животных; n–количество животных в группе

Рисунок 3 – Относительный уровень экспрессии генов *Gabra2* и *Gabrb1* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 перцентили)

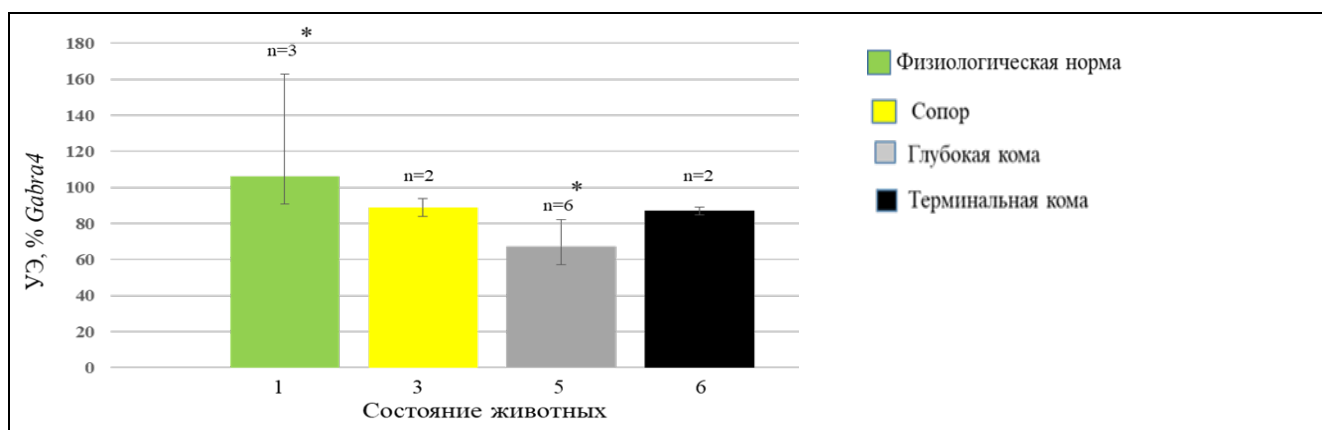
Для гена, кодирующего α_2 -субъединицу ГАМК_A-рецептора, с учетом межгруппового сравнения показателей УЭ, установлено достоверное ($p=0,033$) снижение (в 2 раза) уровня экспрессии в головном мозге крыс, состояние которых относилось к «сопору», по сравнению с крысами, состояние которых описывалось, как «оглушение» (рисунок 3, А). Для гена *Gabrb1*, используя множественное сравнение относительного уровня экспрессии гена, было установлено,

что уровень экспрессии гена *Gabrb1* в головном мозге крыс, характеризующихся неврологическим статусом «норма», был выше в 6 раз по сравнению с особями, состояние которых относилось к «сопору». Кроме того, показатель УЭ гена *Gabrb1* был достоверно выше (в 3,5 раза) в группе животных с показателем ИТНН «оглушение», по сравнению с животными из группы с состоянием «сопор» (рисунок 3, Б).

В ходе оценки тяжести неврологических нарушений у предварительно алкоголизованных крыс спустя 8 часов после острого введения этанола различия уровней экспрессии у животных, характеризующихся разными состояниями («физиологическая норма»/«сопор»/«глубокая кома»/«терминальная кома»), были выявлены для гена, кодирующего α_4 -субъединицу ГАМК_A-рецептора.

На основании данных, приведенных на рисунке 4, установлено, что УЭ гена *Gabra4* в головном мозге животных с показателем ИТНН, соответствующем «глубокой

коме», был (в 1,6 раза) ниже, чем у животных, состояние которых относилось к «физиологической норме».



* – статистически значимые различия показателя между группами животных; n–количество животных в группе

Рисунок 4 – Относительный уровень экспрессии гена *Gabra4* в головном мозге экспериментальных животных, Me (25; 75 перцентили)

В результате проведённых в данном разделе исследований нами показано, что степень выраженности патологических процессов при острой и хронической интоксикации сопряжена с генетическими особенностями ГАМК_A-рецепторов. Установленная связь уровней экспрессии генов *Gabra2* и *Gabrb1* (на крысах, перенесших острое отравление без предшествующей алкоголизации) и *Gabra4* (на предварительно алкоголизированных крысах) с тяжестью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после его введения, в конечном итоге, может являться маркером токсического действия исследуемого токсиканта.

Наряду с исследованием уровня экспрессии, активно проводится изучение полиморфных участков генов в ответных реакциях организма при употреблении этанола. В связи с этим на следующем этапе исследований представлялось целесообразным выявить аллельные варианты генов-кандидатов, оценить уровень экспрессии целевого гена у животных с различными генотипами и выявить их возможную взаимосвязь, а также установить ассоциации полиморфизмов с глубиной депримирующего воздействия этанола на нервную систему.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ОТДЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА, НА ТЯЖЕСТЬ УГНЕТЕНИЯ ЦНС

4.1. Выявление аллельных вариантов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra5*, *Gabra6* и *Gabrb1* у белых беспородных крыс для установления их ассоциации с глубиной депримирующего воздействия этанола на нервную систему

Для определения перечня полиморфизмов проводили информационно-теоретический поиск. Анализ информации, приведенной (в 2014 г.) в базах данных Национального Центра Биотехнологической информации США (National Center for Biotechnology Information, NCBI), позволил выявить наличие

полиморфизма ДНК генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1*. Для гена *Gabra5*, обнаруженное отсутствие полиморфизмов в популяции крыс, вероятно, являлось следствием консервативности его нуклеотидной последовательности. Выявленные полиморфизмы находились в различных структурных частях соответствующих нуклеотидных последовательностей. Известно, что влияние на ассоциацию с фенотипическими признаками могут оказывать точечные замены, расположенные в 3' – нетранслируемой области (3' – UTR), а также локализованные, как в кодирующей части (экзонные замены), так и в не кодирующих участках гена (интронные замены). [Антонцева Е. В., 2011].

В данной работе мы использовали однонуклеотидные полиморфизмы, локализованные в разных областях гена - регуляторного региона 3' – UTR, экзонной и интронной областях, для оценки функциональной значимости каждого региона в патогенетических механизмах отравления этанолом (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1*

№	Полиморфизм (аллели)	Наименование гена	Область гена	Тип полиморфизма
1	rs107127945 (G/T)	<i>Gabra1</i>	3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
2	rs197587817 (C/T)		Экзон	Синонимичный (115 Leu/Leu)
3	rs105733011 (C/T)	<i>Gabra2</i>	Экзон	Синонимичный (406 Ala/Ala)
4	rs8168342 (A/G)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
5	rs198286814 (A/G)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
6	rs198837638 (A/G)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
7	rs107413315 (A/T)	<i>Gabra3</i>	Интрон	Интронный
8	rs105096249 (A/T)		Интрон	Интронный
9	rs197596713 (G/T)	<i>Gabra4</i>	Интрон	Интронный
10	rs105966045 (A/G)		Интрон	Интронный
11	rs106047548 (C/T)	<i>Gabra6</i>	Интрон	Интронный
12	rs107063497 (C/T)		Экзон	Несинонимичный, миссенс (52 Arg/Gln)
13	rs13456854 (C/T)	<i>Gabrb1</i>	3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
14	rs13456853 (C/T)		3' – UTR	Полиморфизм регуляторного региона
15	rs13456852 (C/T)		Экзон	Несинонимичный, миссенс (447 Asn/Lys)
16	rs13456851 (C/T)		Экзон	Несинонимичный, миссенс (432 Arg/Arg)

На заключительном этапе отбора полиморфных маркеров осуществляли генетический анализ (с использованием метода ПЦР-РВ) образцов ДНК, выделенных из периферической венозной крови крыс. Проведенное

генотипирование образцов ДНК лабораторных животных позволило определить частоты аллельных вариантов, не приведенных в базе данных dbSNP (NCBI), и установить генетическое разнообразие для 11 (из 16 исследуемых) полиморфизмов: *Gabra1* (rs107127945, rs197587817); *Gabra2* (rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638); *Gabrb1* (rs13456854, rs13456852, rs13456851); *Gabra3* (rs105096249); *Gabra4* (rs197596713), которые могут влиять на степень интоксикации этанолом у крыс (таблица 4).

Таблица 4 - Распределение частот генотипов полиморфных вариантов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4*, *Gabra6* и *Gabrb1* у исследуемой популяции крыс

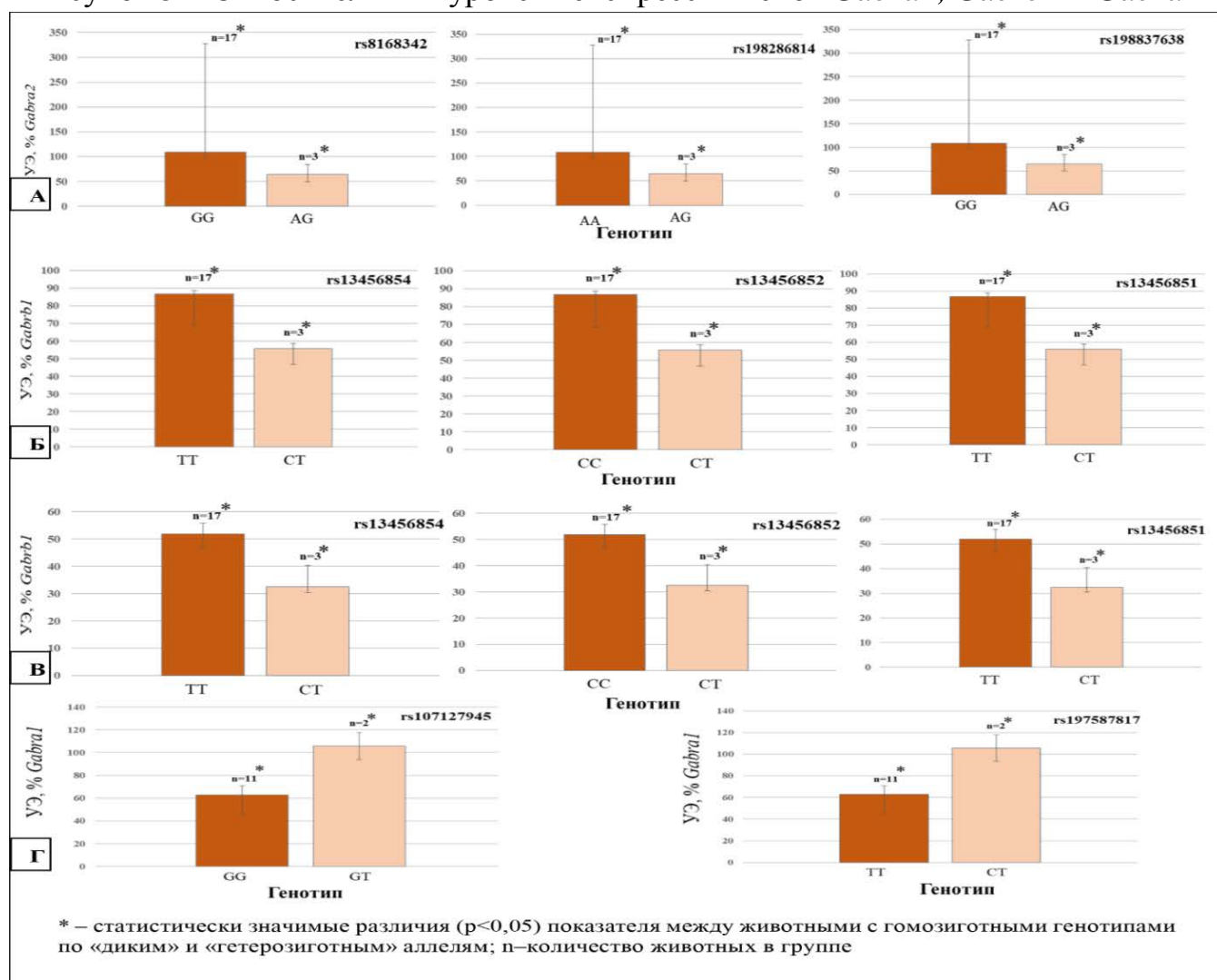
№ п/п	Генетический вариант	Количество животных с различными генотипами, N (%)		
		Гомозигота по «дикому» аллелю	Гетерозигота	Гомозигота по «редкому» аллелю
<i>Gabra1</i>				
1	G/T (rs107127945)	60 (75,00)	19 (23,75)	1 (1,25)
2	C/T (rs197587817)	57 (71,25)	22 (27,5)	1 (1,25)
<i>Gabra2</i>				
3	C/T (rs105733011)	65 (81,25)	15 (18,75)	0 (0)
4	A/G (rs8168342)	67 (83,75)	13 (16,25)	0 (0)
5	A/G (rs198286814)	66 (82,50)	14 (17,50)	0 (0)
6	A/G (rs198837638)	68 (85,00)	12 (15,00)	0 (0)
<i>Gabra3</i>				
7	A/T (rs107413315)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
8	A/T (rs105096249)	68 (85,00)	12 (15,00)	0 (0)
<i>Gabra4</i>				
9	G/T (rs197596713)	56 (70,00)	22 (27,50)	2 (2,50)
10	A/G (rs1055966045)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
<i>Gabra6</i>				
11	C/T (rs106047548)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
12	C/T (rs107063497)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
<i>Gabrb1</i>				
13	C/T (rs13456854)	70 (87,50)	9 (11,25)	1 (1,25)
14	C/T (rs13456853)	80 (100,00)	0 (0)	0 (0)
15	C/T (rs13456852)	71 (88,75)	8 (10,00)	1 (1,25)
16	C/T (rs13456851)	69 (86,25)	11 (13,75)	0 (0)

4.2. Изучение зависимости уровня экспрессии генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* от генотипа крыс

Некоторые однонуклеотидные точечные замены посредством влияния на процесс транскрипции могут приводить к изменению уровня экспрессии генов, что в конечном итоге может быть основой неврологических нарушений при отравлении этанолом. В связи с этим было изучено: является ли функциональная активность (определяемая в виде уровня экспрессии) исследуемых генов признаком, зависимым от полиморфизма. Для решения этой задачи было проведено исследование по оценке влияния генотипа исследуемых групп животных

(интактных и предварительно алкоголизованных животных, а также крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации и без нее) на УЭ генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* (рисунок 5).

Рисунок 5 – Относительный уровень экспрессии генов *Gabra2*, *Gabrb1* и *Gabra1*



в головном мозге крыс от генотипа, Me (25; 75 перцентили)

В результате проведенных исследований обнаружено, что полиморфные локусы генов *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabrb1* определяют уровень их экспрессии:

1) генотипы A/G (rs8168342, rs198286814 и rs198837638) и C/T (rs13456854, rs13456852 и rs13456851) у интактных крыс определяют более низкий уровень экспрессии генов *Gabra2* (до 44%) и *Gabrb1* (до 31%), соответственно (рисунок 5, А и Б, соответственно);

2) генотип С/Т (rs13456854, rs13456852 и rs13456851) у крыс, получавших этанол в течение месяца, определяет более низкий (до 20%) уровень экспрессии гена *Gabrb1* (рисунок 5, В).

3) генотипы G/Т (rs107127945) и С/Т (rs197587817) предварительно алкоголизованных крыс спустя 8 часов острого воздействия этанолом, напротив, определяют более высокий (до 43%) уровень экспрессии гена *Gabra1* (рисунок 5, Г).

Полученные результаты на модели интактных и предварительно алкоголизованных животных, а также крыс, перенесших острое отравление этанолом на фоне предварительной алкоголизации, свидетельствуют о том, что генетические полиморфизмы в генах *Gabra1*, *Gabra2* и *Gabrb1* могут определять уровень их экспрессии и тем самым оказывать влияние на проявление интоксикации этанолом. Однако, хорошо известно, что доказательство связи полиморфизма с экспрессией гена является трудной, сложной задачей экспериментальной, а также молекулярной генетики и требуют дополнительных исследований. В связи с этим полученные результаты представляют особый интерес для дальнейших изучений в условиях модельных систем. Последующие исследования, вероятно, смогут более полно прояснить связь между генотипами генов ГАМК_A-рецептора и уровнем экспрессии гена.

Ввиду того, что полиморфизмы генов оказывают влияние на уровень их экспрессии, на следующем этапе представлялось целесообразным исследовать влияние однонуклеотидных точечных замен на степень депримирующего действия этанола.

4.3. Влияние полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* на степень депримирующего действия этанола при острой интоксикации животных

Основной задачей данной части работы являлось определение возможного влияния однонуклеотидных точечных замен (генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1*) на формирование степени тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему крыс с острым отравлением этанолом и острым отравлением этанолом на фоне предварительной алкоголизации.

Сравнительный анализ распределения генотипов по каждому полиморфизму между группами животных, характеризующихся разными состояниями после острого воздействия этанола, позволил установить ассоциацию полиморфных локусов со степенью интоксикации у крыс, перенесших острое отравление этанолом, а также определить полиморфизмы, определяющие повышенный риск гибели предварительно алкоголизованных крыс после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀.

В результате проведенных исследований на модели крыс, перенесших острое отравление этанолом, не выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$) в распределении частот генотипов в группах животных, характеризующихся разными неврологическими статусами (спустя 3 часа после острого отравления). Отсутствие значимых различий, на наш взгляд, вероятно

связано с тем, что основная часть животных имела умеренные характеристики неврологических нарушений (состояние «умеренная кома» – 78% крыс) (рисунок 1, А).

Данные, представленные на рисунках 1, А и 1, Б демонстрируют, что спустя 8 ч после острого отравления этанолом у некоторых животных произошло восстановление статуса неврологических показателей до состояния «физиологическая норма» или «оглушение». Состояние остальных выживших животных

оценивалось как «сопор» или «умеренная кома». На основании проведенного анализа статистически значимых различий распределения частот генотипов в исследуемых группах не обнаружено. Отсутствие достоверных отличий может быть связано с тем, что определение статистических различий частот генотипов проводился у групп животных, состояние которых характеризовалось близкими визуально оцениваемыми клиническими проявлениями, разделенными на семь типов индекса тяжести неврологических нарушений. Тем не менее, наблюдаемое различие в частотах генотипов может свидетельствовать о наличии их связи с тяжестью депримирующего воздействия этанола, а использование подхода, основанного на анализе различий генотипов по объединенным группам (на основании состояния крыс), может позволить выявить ассоциацию между аллелем и степенью интоксикации.

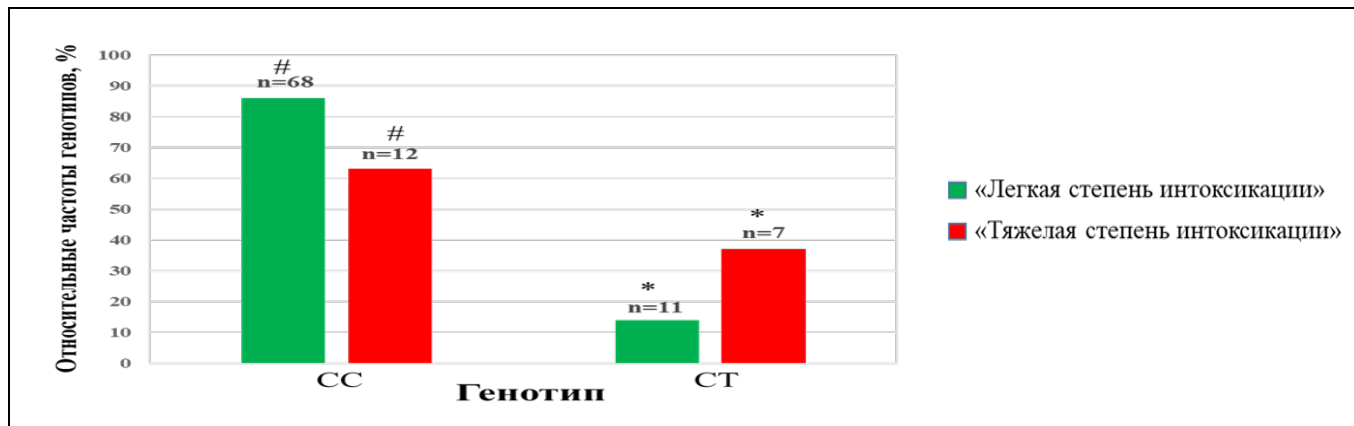
В связи с этим нами был разработан методический аппарат, позволяющий оценить вклад полиморфизмов в развитие той или иной степени интоксикации. Для этого оценку ассоциации исследуемых полиморфизмов со степенью угнетения ЦНС после введения этанола проводили у животных двух групп, объединенных по общему признаку – степени интоксикации.

Крысы, состояние которых через 8 часов после острого воздействия этанолом оценивалось как «физиологическая норма» и «оглушение», вошли в группу «легкая степень интоксикации». Животные, находящиеся в состоянии «сопор», «поверхностная кома», «глубокая кома», «терминальная кома», «летальный исход», были объединены в группу «тяжелая степень интоксикации».

В ходе дальнейшего анализа данных, полученных путем сравнения частот генотипов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* между объединенными группами животных (на основании состояния), выяснилось, что частоты генотипов С/С и С/Т полиморфного маркера rs105733011 по гену *Gabra2* в группах крыс с «легкой степенью интоксикации» и «тяжелой степенью интоксикации»

достоверно отличаются между собой ($p=0,042$, $\chi^2 = 5,37$). Данные, представленные на рисунке 6 демонстрируют, что частота встречаемости генотипа С/Т была значимо выше среди животных группы «тяжелая степень интоксикации» – 37,0%, чем в группе «легкая степень интоксикации» – 14%. В то же время достоверное преобладание генотипа С/С в группе животных «легкое течение алкогольной интоксикации» свидетельствует об ассоциации гомозиготного варианта С/С с пониженным риском развития «тяжелой степени интоксикации».

Кроме того, рассчитанное значение отношения шансов (OR = 3,62 с доверительным интервалом: ДИ = [1,17–11,15]) дает нам основание утверждать, что, скорее всего, носительство аллеля *T* в гетерозиготном состоянии в 3,6 раза увеличивает риск развития тяжелых неврологических состояний («сопор», «поверхностная кома», «глубокая кома», «терминальная кома», «летальный исход») спустя 8 ч после острой интоксикации этанолом.



*, # – значимые ($p < 0,05$) различия между группами животных с различными генотипами; n – количество животных в группе

Рисунок 6 – Распределение генотипов полиморфизма rs105733011 гена *Gabra2* у крыс в группах «легкая степень интоксикации» и «тяжелая степень интоксикации»

Выявленная ассоциация гетерозиготного генотипа С/Т с риском развития «тяжелой степени интоксикации» может позволить использовать полиморфный локус rs105733011 гена *Gabra2* в качестве маркера, прогнозирующего тяжесть депримирующего действия этанола при острой интоксикации крыс.

Исходя из того, что степень интоксикации крыс в ответ на острое введение этанола у крыс может быть обусловлена молекулярно-генетическими особенностями, представлялось важным провести исследования по выявлению связи полиморфизмов генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* со степенью угнетения ЦНС на модели острой интоксикации этанолом предварительно алкоголизованных крыс.

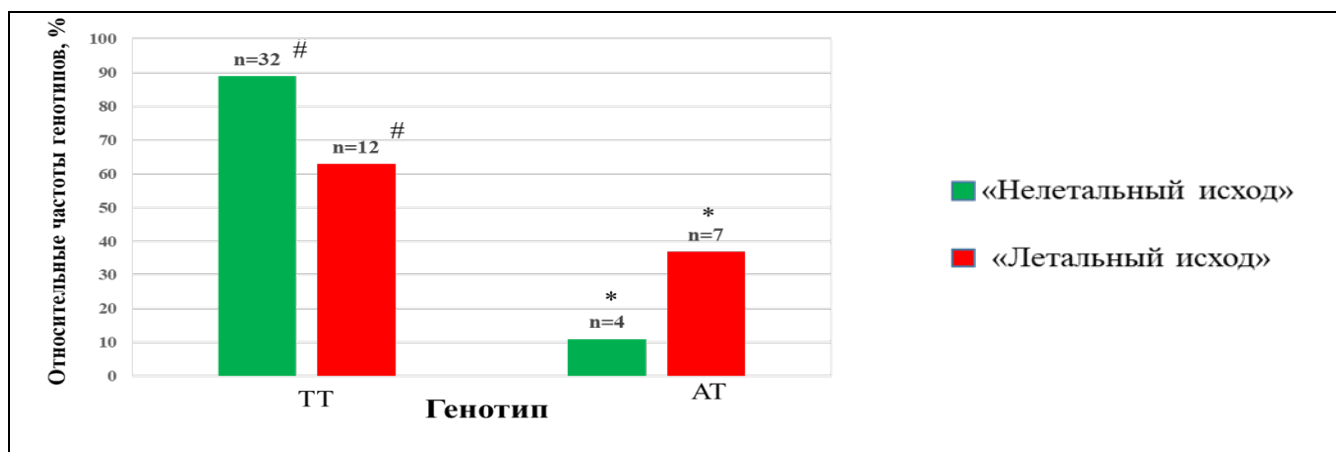
Через 3 и 8 часов после острого отравления этанолом распределение частот генотипов полиморфных локусов исследуемых генов у соответствующих групп предварительно алкоголизованных животных (рисунок 1, В и Г, соответственно) достоверно не отличались. Тем не менее на уровне тенденции отмечено

различие частот встречаемости для полиморфизмов *Gabra1* rs107127945, *Gabrb1* rs13456854, *Gabrb1* rs13456852, *Gabrb1* rs13456851 – спустя 3 ч и для полиморфизма *Gabra4* rs197596713 – спустя 8 часов после острого воздействия этанола. Учитывая, что количество крыс в некоторых группах с разными состояниями

было меньше двух, нами было предложено использовать подход объединения нескольких групп на основании общего признака. Принимая во внимание высокую летальность (на фоне предварительной алкоголизации) в исследуемой

выборке крыс, была разработана методика оценки выживаемости крыс после острого отравления этанолом с учетом полиморфизмов генов ГАМК_A-рецептора. Таким образом, сравнение частот встречаемости генотипов проводили у животных двух групп: «нелетальный исход» и «летальный исход» спустя 3 часа и 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀.

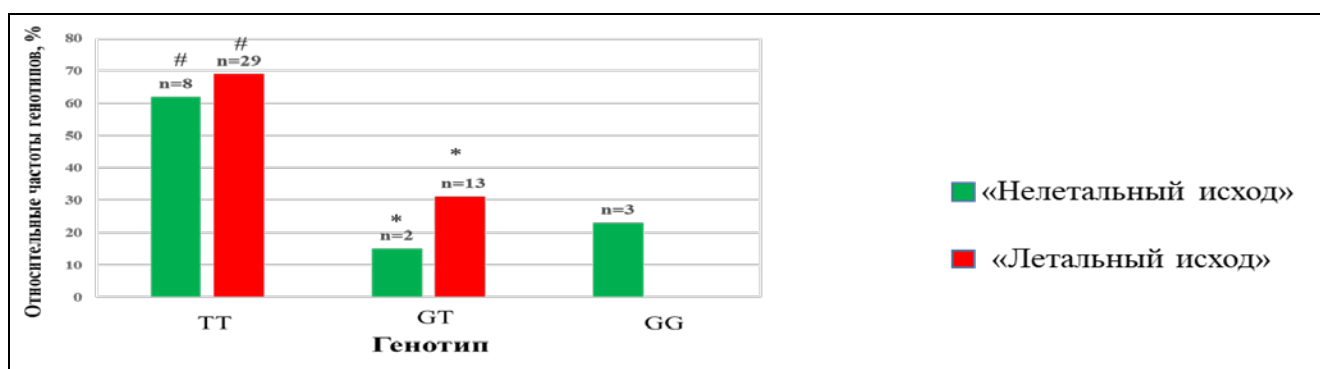
При сопоставлении объединенных групп (на основании выживаемости крыс спустя 3 часа после интоксикации) по частотам генотипов обнаружилось, что в группе «летальный исход» частота генотипа *Gabra3** rs10509624*А/Т выше (37% против 11% в группе «нелетальный исход»), а частота генотипа *Gabra3** rs10509624*Т/Т ниже (63% против 89% в группе «нелетальный исход») (рисунок 7).



*, # – значимые ($p < 0,05$) различия между группами животных с различными генотипами; n – количество животных в группе

Рисунок 7 – Распределение генотипов полиморфизма rs105096249 гена *Gabra3* у предварительно алкоголизованных крыс в группах «нелетальный исход» и «летальный исход»

При сравнении частот встречаемости полиморфизмов изучаемых генов среди животных групп «нелетальный исход» и «летальный исход» (спустя 8 ч после введения этанола) были установлены значимые ($p = 0,015$, $\chi^2 = 10,67$) различия в распределении генотипов полиморфизма rs197596713 гена *Gabra4*. А именно, частоты генотипов Т/Т и G/Т были выше в группе невыживших крыс, по сравнению с группой выживших животных – 69% против 62% (для Т/Т) и 31% против 15% (для G/Т), соответственно (рисунок 8).



*, # – значимые ($p < 0,05$) различия между группами животных с различными генотипами; n – количество животных в группе

Рисунок 8 – Распределение генотипов полиморфизма rs197596713 гена *Gabra4* у предварительно алкоголизованных крыс в группах «нелетальный исход» и «летальный исход»

При объединении носителей T/T и G/T в одну подгруппу достоверность различий возросла ($p = 0,001$, $\chi^2 = 10,25$), а рассчитанное значение отношения шансов (OR=28,33) позволяет отнести аллель T (генотип T/T и G/T) к факторам риска гибели при остром отравлении этанолом на фоне предварительной алкоголизации.

Таким образом, проведенная оценка влияния полиморфных маркеров генов *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra3*, *Gabra4* и *Gabrb1* на степень выраженности коматозного состояния у экспериментальных животных после острого отравления этанолом позволила выявить наиболее вероятные варианты генов, которые можно рассматривать как факторы повышенного риска тяжелого течения алкогольной комы.

Для животных, перенесших острое отравление этанолом, обнаружено, что маркером, прогнозирующим тяжесть депримирующего действия этанола при острой интоксикации крыс (спустя 8 ч), является генотип C/T полиморфного локуса rs105733011 по гену *Gabra2*.

На модели предварительно алкоголизованных крыс выявлены факторы повышенного риска гибели крыс при отравлении этанолом: генотип A/T (rs10509624) по гену *Gabra3* (спустя 3 часа) и генотипы T/T, G/T (rs197596713) по гену *Gabra4* (спустя 8 часов).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование позволило подтвердить предположение о том, что токсическое действие этанола на организм, побочные эффекты, возникающие после отравления токсикантом, а также тяжесть депримирующего действия этанола на ЦНС определяется не только дозой, способами поступления алкоголя, но и индивидуальными характеристиками организма. Для определения молекулярно-генетических маркеров, определяющих степень тяжести при острой и хронической интоксикации этанолом, нами было проведено изучение влияния этанола на нервную систему лабораторных животных в зависимости от генетических особенностей ГАМК_A-рецептора. В итоге были выявлены закономерности изменения экспрессии генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, после острого и хронического воздействия этанолом, которые позволили расширить теоретические представления о депримирующем действии токсиканта на ГАМК-ергическую нейромедиаторную систему. Наши данные о связи уровня мРНК ряда субъединиц ГАМК_A-рецептора со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после введения этанола в дозе 0,8 ЛД₅₀, а также с большей выраженностью тяжести проявлений интоксикации этанолом являются новыми и дают основания для более детальных экспериментальных исследований. Кроме того, полученные в работе данные о

связи полиморфизмов генов, кодирующих отдельные субъединицы ГАМК_A-рецептора, с глубиной депримирующего эффекта этанола на нервную систему могут послужить систематической основой для определения исхода алкогольной интоксикации при длительном воздействии этанола на нервную систему, а также установления степени интоксикации острых состояний отравленных животных.

Подводя итог, можно сказать, что результаты, полученные на экспериментальных животных, позволили показать важную роль генетических маркеров ГАМК_A-рецептора в определении глубины тяжести депримирующего действия этанола на нервную систему. Кроме того, можно предполагать, что существующие врожденные, наследуемые особенности структуры генов, кодирующих ГАМК_A-рецептора, которые определяют степень интоксикации у крыс, также смогут обуславливать различия в реакции организма на этанол у людей. Дальнейшие исследования в данной области, вероятно, смогут более полно прояснить взаимосвязь между генотипами генов, кодирующих ГАМК_A-рецептор, и реакцией организма человека при действии этанола. Особый научный интерес может представлять разработка алгоритма генетического прогнозирования депримирующего действия этанола на ЦНС организма человека с целью его применения для профессионального отбора сотрудников, чья работа связана непосредственно с контактом токсиканта, а также для клинической оценки степени интоксикации состояния отравленных индивидуумов.

Обобщая, можно говорить о том, что результаты проведенного исследования представляют теоретическую и экспериментально-методическую основу персонализированной медицины. Кроме того, молекулярно-генетические методы, используемые в данной работе, являются одними из превалирующих в изучении биологических аспектов жизнедеятельности организмов. Таким образом, можно предполагать, что полученные результаты исследования будут являться основой для разработки дополнительных медицинских и профилактических мероприятий, основанных на использовании генетических особенностей организма. Изучение молекулярно-генетических особенностей генов, кодирующих субъединицы ГАМК_A-рецептора, а также использование их в качестве маркеров прогнозирования исхода интоксикации может быть предметом будущих исследований.

В результате данного исследований решена научная задача по определению молекулярно-генетических особенностей ГАМК_A-рецептора, с которыми связана степень тяжести интоксикации этанолом. В ходе выполнения диссертационной работы получены следующие **выводы**:

ВЫВОДЫ

1. Острая и хроническая интоксикации этанолом влияют на уровни мРНК альфа (α_1 -, α_2 -, α_3 -, α_4 -, α_5 -, α_6 -) и бета (β_1) -субъединицы ГАМК_A-рецептора крыс в гиппокампе лабораторных животных. Существуют различия в изменениях уровней мРНК ряда субъединиц в гиппокампе крыс в зависимости от схем экспериментальной интоксикации.

2. Уровень мРНК ряда субъединиц ГАМК_A-рецептора связан со степенью депримирующего действия этанола спустя 8 часов после введения

этанолом в дозе 0,8 ЛД₅₀, а также с большей выраженностью тяжести проявлений интоксикации этанолом у лабораторных крыс.

3. Установлено генетическое разнообразие аллельных вариантов для 11 полиморфизмов: *Gabra1* (rs107127945, rs197587817); *Gabra2* (rs105733011, rs8168342, rs198286814, rs198837638); *Gabrb1* (rs13456854, rs13456852, rs13456851); *Gabra3* (rs105096249); *Gabra4* (rs197596713).

4. Комбинации аллелей генов *Gabra2*, *Gabra3* и *Gabra4* определяют глубину тяжести угнетения ЦНС на модели острой интоксикации этанолом крыс.

5. Значимым молекулярным маркером для определения «тяжелой степени интоксикации» спустя 8 часов после острого отравления этанолом крыс является генотип С/Т (rs105733011) по гену *Gabra2*.

6. Маркерами повышенной гибели предварительно алкоголизованных крыс спустя 3 часа после острого отравления этанолом является генотип А/Т (rs10509624) по гену *Gabra3*, спустя 8 часов – аллельные комбинации Т/Т, G/Т (rs197596713) по гену *Gabra4*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты выполненных исследований рекомендуется использовать:

– для установления критериев тяжести алкогольной интоксикации на этапе доклинической оценки глубины депримирующего действия этанола на нервную систему при острых отравлениях этанолом;

– для разработки методических рекомендаций по установлению исхода алкогольной интоксикации на модели животных, перенёсших острые отравления алкоголем на фоне предварительной алкоголизации;

– для разработки прогностических маркеров степени индивидуального биологического риска при острых и хронических интоксикациях этанолом;

– для обоснования комплекса лечебно-восстановительных мероприятий (применяемых после алкогольных отравлений) при проведении их доклинических исследований.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Осечкина, Н. С.** Генетические особенности, определяющие различие эффектов воздействия этанола на организм / Н. С. Осечкина, Г. В. Назаров, Е. Ю. Бонитенко [и др.] // Medline. – 2013. – № 14. – С. 993-1007.

2. **Осечкина, Н. С.** Влияние экспрессии и полиморфизма генов, кодирующих ГАМК-рецепторы, на тяжесть депримирующего действия этанола у крыс / Н. С. Осечкина, Г. В. Назаров, Е. Ю. Бонитенко [и др.] // Токсикологический вестник. – 2014. – № 6. – С. 22-27.

3. **Бабкин, А. В.** Ассоциация полиморфных вариантов гена *Vche* с активностью бутирилхолинэстеразы крыс после отравления малатионом /

А. В. Бабкин, **Н. С. Осечкина**, И. С. Бердинских [и др.] // Токсикологический вестник. – 2014. – № 5 (128). – С. 16-20.

4. Бердинских, И. С. Генетические особенности, определяющие различный уровень экспрессии гена OPRM1 у крыс после воздействия N-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида» / И. С. Бердинских, **Н. С. Осечкина**, А. В. Бабкин [и др.] // Токсикологический вестник. – 2015. – № 3 (132). – С. 49-53.

5. Бабкин, А. В. Изучение влияния атропина на экспрессию генов *Ache* и *Vche* при отравлении крыс малатионом / А. В. Бабкин, **Н. С. Осечкина**, И. С. Бердинских [и др.] // Токсикологический вестник. – 2015. – № 6 (135). – С. 22-26.

6. **Осечкина, Н. С.** Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих ГАМКА-рецепторы, при хронической и острой интоксикации этанолом лабораторных крыс / Н. С. Осечкина, М. Б. Иванов, Г. В. Назаров [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – № 10. – С. 451-454.

7. **Осечкина, Н. С.** Влияние полиморфизма гена *Gabra2* на степень отравления крыс при острой интоксикации этанолом / Н. С. Осечкина, Г. В. Назаров, М. Б. Иванов [и др.] // Токсикологический вестник. – 2019. – № 3 (156). – С. 3-7.

Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференции

1. Бабкин, А. В. Выявление генетических маркеров, ассоциированных с биотрансформацией нифедипина / А. В. Бабкин, **Н. С. Осечкина**, И. С. Бердинских [и др.] // Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности», 18 – 20 сентября 2013, г. Санкт-Петербург, 2013. – С. 127-128.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАМК	—	Гаммааминомасляная кислота
ГАМК _A -рецептор	—	Рецептор гаммааминомасляной кислоты типа А
ДНК	—	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИТНН	—	Индекс тяжести неврологических нарушений
кДНК	—	Комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛД ₅₀	—	Среднелетальная доза
мРНК	—	Матричная рибонуклеиновая кислота
ПЦР	—	Полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ	—	Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
РНК	—	Рибонуклеиновая кислота
УЭ	—	Уровень экспрессии
ЦНС	—	Центральная нервная система
CI 95%	—	Доверительный интервал с вероятностью 95%
<i>Gabra1-6</i>	—	Ген α_1 - α_6 субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>Gabrb1</i>	—	Ген β_1 -субъединицы ГАМК _A -рецептора крысы
<i>GABRA1-A6</i>	—	Ген α_1 - α_6 субъединицы ГАМК _A -рецептора человека

GABRG2 — Ген γ_2 -субъединицы ГАМК_A-рецептора человека
SNP — Однонуклеотидный полиморфизм

Подписано в печать: