

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Михайловой Елены Викторовны «Меланокортиновая и серотониновая системы гипоталамуса и среднего мозга в норме и при метаболическом синдроме у мышей и крыс», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.01 – физиология и 03.01.04 – биохимия.

Интегративные механизмы нейроэндокринной регуляции основаны на многосторонних связях между различными нейротрансмиттерами. В современной нейробиологии накоплена солидная база данных, касающаяся «cross-talk» взаимодействий между моноаминергическими системами. Известно, что терминали серотонинергических нейронов образуют синаптические связи с норадренергическими и дофаминергическими нейронами, благодаря которым координируется их активность, направленная на регуляцию различных звеньев поведенческой активности и гомеостаза.

Помимо моноаминергических нейронов в поддержании постоянства внутренней среды организма имеет существенное значение меланокортиновая система мозга, известная своим участием в регуляции энергетического баланса и пищевого поведения. Нейроэндокринные центры, обеспечивающие эти процессы, локализованы в гипоталамусе, где основным источником нейронов, генерирующих проопиомеланокортин, является аркуатное ядро. От тел меланокортинергических нейронов отходят проекции в средний мозг, в области где находятся тела серотонинергических нейронов.

Вместе с тем гипоталамус получает сам по себе иннервацию из серотонинергических ядер шва. Таким образом, серотонинергическая система участвует в регуляции различных аспектов активности гипоталамуса, включая регуляцию основных нейроэндокринных осей. В частности, продемонстрирована серотонинергическая регуляция активности оси гипоталамус-гипофиз надпочечники в условиях стресса как такового и связанных со стрессом заболеваний. К таким заболеваниям относятся

метаболический синдром, представляющий из себя комплекс функциональных расстройств, сформировавшихся на основе развития инсулино-резистентности. Выше приведенные факты свидетельствуют в пользу наличия взаимодействий между серотонинергической и меланокортиновой системами мозга в норме и предполагать наличие определенных aberrаций в их взаимодействии при метаболическом синдроме. Однако исследования в этих направлениях до сих пор не проводились. Поэтому актуальность выбранной темы диссертации не вызывает сомнения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой, основанной на достаточно большом материале с применением современных методов исследований. Несомненным достоинством является постановка всех исследований на мышах и крысах, что позволяет выявить универсальные изменения, присущие метаболическому синдрому и его видоспецифические особенности. Метаболический синдром был инициирован надежным валидированным методом, в котором ключевым звеном является обогащенный триглицеридами пищевой рацион. У животных ряд метаболических параметров, таких как уровень глюкозы в крови, а также глюкозо-толерантный тест определялись прижизненно. Содержание серотонина и его метаболита 5 гидроксиндолил ацетата определялись путем Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии. Содержание белков в гипоталамусе и в среднем мозге определяли биотин-стрептавидиновой иммуно-гистохимической методикой, а для анализа распределения белков в структурах мозга использовали двойное флуоресцентное иммуномечение. В исследованиях также использовались Вестерн-блоттинг и ПЦР в реальном времени.

Результаты исследований обработаны методом вариационной статистики, применяемым для малых выборок, с принятием доверительной

вероятности $p \leq 0,05$. Все научные положения, выводы и рекомендации, представленные в диссертации, изложены четко и конкретно. Выводы и практические рекомендации достоверны, аргументированы и отвечают поставленной цели и задачам.

Достоверность и новизна полученных результатов. Диссертация написана доступным языком, грамотно оформлена, иллюстрирована таблицами и рисунками. Автором подробно описана методология исследования, выполнена математическая обработка данных, проведен анализ результатов исследования в сравнении с данными отечественных и зарубежных авторов. Достоверность полученных результатов прежде всего выражается в том, что они получены на разных родах лабораторных животных.

Автором впервые установлено что, экспрессия меланокортиновых рецепторов присутствует в серотонинергических ядрах стволовых структур мозга. Соответственно безусловной новизной работы является продемонстрированная Е.В. Михайловой потенциальная возможность непосредственного влияния меланокортиновых пептидов на продукцию серотонина. Кроме того, продемонстрировано присутствие 5-HT_{1B} рецепторов в проопиомеланокортиновых нейронах, что иллюстрирует способность серотонинергических нейронов влиять на синтез проопиомеланокортина и его пептидов в аркуатном ядре. Но особенно интересным фактом, является обнаружение экспрессии триптофангидроксилазы в гипоталамусе, что указывает на возможность непосредственного образования серотонина в гипоталамусе. Более того показано усиление экспрессии триптофангидроксилазы при различных вариантах ожирения. Заслуживают внимания установленные автором факты нарушения серотонинового сигналинга в проопиомеланокортиновых нейронах и меланокортинового сигналинга в серотонинергических нейронах. Важной является информация о защитной роли Akt1 в контексте поддержания жизнеспособности серотонинергических нейронов при

экспериментальном ожирении. Основные положения и результаты диссертационной работы апробированы на всероссийских, международных и региональных научно-практических конференциях, съездах.

Значимость для науки и практики результатов диссертации.

Е.В. Михайловой удалось установить нейробиологические звенья взаимодействия между проопиомеланокортиновыми нейронами гипоталамуса и серотонинергическими нейронами среднего мозга в условиях диета-индуцированного ожирения. Получены новые знания об источниках биосинтеза серотонина в различных структурах мозга в норме и при экспериментальном ожирении, а также свидетельствуют о важной роли меланокортиновой системы в компенсации нарушенного синтеза серотонина различной этиологии. Это позволило сформулировать новое представление о роли меланокортиновой системы мозга в регуляции энергетического баланса организма. Это позволяет выявить новые молекулярные мишени для коррекции метаболического синдрома среди компонентов меланокортиновой и серотониновой систем головного мозга. Практическая значимость работы может быть рассмотрена в свете разработки новых путей таргетной терапии различных проявлений метаболического синдрома. Эти данные могут быть использованы при разработке фармакологических стратегий для предотвращения патологических процессов, вызванных избыточной массой тела и МС. Однако у мышей с генетически-обусловленным меланокортиновым ожирением этого не было выявлено, что может свидетельствовать о существовании различных компенсаторных путей при ожирении различной этиологии. Таким образом, терапевтические подходы к лечению и предупреждению диета-индуцированного и генетически обусловленного ожирения должны различаться.

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в курсах лекций и практических занятий для студентов биологических факультетов университетов, а также для студентов медицинских вузов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано более 20 научных

работ. Из них 8 статей опубликованные в рецензируемых российских журналах, а также в международном издании - *Neurochemical Research*.

Оценка содержания работы. Диссертационная работа выполнена по классической схеме, изложена на 146 страницах машинописного текста, иллюстрирована, 56 рисунками и 8 таблицами. Работа Михайловой Е.В. состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, исследования, описания результатов собственных исследований, и их обсуждения, заключения и выводов. Список литературы включает 329 источника (15 отечественных, 314 зарубежных).

Во введении представлены актуальность темы исследований, цель и задачи исследования, методология и методы исследований, научная новизна, теоретическое и практическое значение, а также положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы подробно проанализированы анатомические нейробиологические и молекулярно-биологические конструкции меланокортиновой и серотониновой систем. Солидная часть обзора посвящена теме метаболического синдрома. Автор рассматривает ее в фокусе нарушений нейроэндокринной регуляции энергетического обмена. Детально рассмотрены особенности меланокортиновой и серотониновых систем мозга в условиях метаболического синдрома.

В главе «Материалы и методы исследования» автором подробно изложен протокол исследования, включая особенности предоставляемой «кафетерий-диеты», иммуногистохимических и иммунофлуоресцентных методов исследований, Вестерн-блоттинга, экстрагирования РНК, методы обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени, Высокоэффективной Жидкостной Хроматографии и оценки метаболического статуса организма с использованием глюкозотолерантного теста. Для изучения влияния метаболических расстройств на функциональное состояние серотониновой и меланокортиновой систем в мозге грызунов у них в этом исследовании индуцировано ожирение с помощью высококалорийной диеты.

Причем в качестве генетической модели метаболического синдрома использовали агути-мышей.

В главах, посвященных результатам собственных исследований, рассматривается экспрессия меланокортинового рецептора MC1R в гипоталамусе и в среднем мозге мышей и крыс. Анализ полученных результатов позволил автору обосновать представление об ауторецепторном значении MC1R. Также приводятся доказательства присутствия серотониновых рецепторов на POMC-нейронах аркуатного ядра гипоталамуса. Как у мышей, так и крыс с помощью двойного флуоресцентного иммуномечения впервые выявлено наличие рецептора 5-HT_{1B}R. Этот факт особенно интересен в контексте вовлечения данного типа рецепторов в ингибирование пищевого поведения и регуляции энергетического обмена.

В условиях экспериментального ожирения у крыс обнаружено снижение экспрессии генов меланокортиновых рецепторов в серотонинергических нейронах среднего мозга, на фоне уменьшения в них уровня триптофангидроксилазы. Исходя из этих результатов, автор формулирует представление об ослаблении меланокортинового сигналинга в среднем мозге при экспериментальном ожирении у крыс. Но при этом автором отмечено наличие компенсаторных механизмов в виде повышенной экспрессии триптофангидроксилазы в нейронах вентральной тегментальной области. Особенно интересно обнаруженное автором увеличение экспрессии протеинкиназы B в серотонинергических нейронах при экспериментальном ожирении. Так, у мышей при диета-индуцированном ожирении обнаружено увеличение уровня фосфорилированных форм триптофангидроксилазы и протеинкиназы B, которые декларируются как компенсаторными механизмами, направленными на поддержание активности и жизнеспособности серотонинергических нейронов.

Эти изменения автор рассматривает также как компенсаторный механизм, направленный на повышение жизнеспособности

серотонинергических нейронов. Изложение полученных результатов органично сочетается с их обсуждением, а заключение и выводы подводят итоги.

В целом работа не вызвала никаких принципиальных возражений. Тем не менее, литературный обзор воспринимался бы более выигрышно, если бы автор представил бы его в иной последовательности. На наш взгляд более рационально начинать его с имеющихся данных по метаболическому синдрому и после этого перейти к меланокортиновой и серотониновой системам.

В ходе рецензирования диссертационной работы к диссертантке возник ряд вопросов:

1. Ожирение в литературе ассоциируется с уменьшением в гипоталамусе экспрессии гена, кодирующего меланокортиновый рецептор 4-го типа. В вашей работе аналогичные результаты получены у мышей *Agouti yellow* с меланокортиновым ожирением (Рис. 38) и при диета-индуцированном ожирении у крысы Вистар (Рис. 43). Однако у мышей C57Bl/6J при развитии ожирения, индуцированного высококалорийной диетой, этого не было выявлено. Напротив, при ожирении, развивающемся в течении 16-ти недель, наблюдается тенденция к увеличению уровня мРНК меланокортинового рецептора 4-го типа. Как Вы можете объяснить этот результат?

2. При диета-индуцированном ожирении, в частности у мышей C57Bl/6J, в нейронах дорзального ядра шва Вы демонстрируете уменьшение уровня триптофангидроксилазы-2 – скорость-лимитирующего фермента биосинтеза серотонина. При этом в нейронах других структур выявлено увеличение экспрессии этого фермента, в частности в нейронах вентральной тегментарной области, которые, как известно, являются дофаминергическими. Как это отражается на продукции дофамина этими нейронами?

3. В обзоре литературы при описании серотонинергической системы

Вы рассматриваете известные данные о мембранном транспорте серотонина, который осуществляет обратный захват этого моноамина из синаптической щели в клетку. Определяли ли Вы уровень серотонинового транспортера в гипоталамусе и среднем мозге в рассматриваемых Вами моделях ожирения? Ведь здесь также могут существовать видовые особенности.

Заключение. Диссертация Михайловой Елены Викторовны «Меланокортиновая и серотониновая системы гипоталамуса и среднего мозга в норме и при метаболическом синдроме у мышей и крыс» является законченной самостоятельно выполненной научно-квалификационной работой, имеющей существенное значение для специальностей физиология и биохимия биологические науки, так как в ее исследовании удалось выявить особенности нейроэндокринной регуляции метаболического синдрома со стороны меланокортиновой и норадренергической систем головного мозга

По актуальности, научной новизне и практической значимости, диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», (утв. Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, ред. от 01.10.2018 г., с изм. от 26.05.2020 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор достоин присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.01 – физиология и 03.01.04-биохимия.

Официальный оппонент, д.б.н., профессор,
Заведующий лабораторией «Перспективных исследований молекулярных механизмов стресса» ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет)», г. Челябинск

В.Э. Цейликман

ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет
Россия, 454080 Челябинск, проспект Ленина, 76
сайт <http://www.su.ru>, телефон: +7 (351) 267-99-00, факс: + +7 (351) 267-99-00,
email: info@su.ru



ПОДПИСЬ УДОСТОВЕРЯЮ

Челябинский ОТДЕЛ КАДРОВ
УНИВЕРСИТЕТА

СТАРИКОВА Е.А.

14.01.2021