

федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
**«ЯРОСЛАВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
ФГБОУ ВО ЯГМУ  
Минздрава России

150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5  
Тел. (4852) 30-56-41 Тел./факс 72-91-42  
<http://www.vsmu.ru> E-mail: [rector@ysmu.ru](mailto:rector@ysmu.ru)

19.01.2021 г. № 05/19-5

На №

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Проректор по научной работе и  
развитию регионального  
здравоохранения  
профессор



А.А.Баранов

« » 2020 г

## ОТЗЫВ

### ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Михайловой Елены Викторовны

«МЕЛАНКОРТИНОВАЯ И СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМЫ ГИПОТАЛАМУСА И  
СРЕДНЕГО МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ У МЫШЕЙ И  
КРЫС», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.04 – биохимия.

**Актуальность заявленной темы.** Меланокортиновая и серотониновая системы мозга вовлечены в регуляцию различных его функций, в частности в регуляцию метаболического баланса и пищевого поведения. Нарушения в обеих этих системах отмечены при различных патологиях, в частности при метаболических расстройствах. В связи с этим исследование молекулярных механизмов, обеспечивающих взаимосвязь между этими системами мозга, представляется актуальной задачей физиологии и биохимии.

**Научная новизна** диссертационного исследования Е.В. Михайловой определяется тем, что автором представлены данные, расширяющие представления о путях влияния меланокортинов на структуры мозга. В частности, впервые показана экспрессия меланокортинового рецептора 1-го типа в гипоталамусе грызунов в норме, при метаболических нарушениях и на фоне развития нейровоспаления. В работе показаны компенсаторные механизмы, направленные на поддержание баланса серотонина в гипоталамусе и среднем мозге на фоне снижения его биосинтеза в нейронах дорзального ядра шва – основного источника серотонинергической иннервации гипоталамуса. Полученные автором данные расширяют представления о возможности биосинтеза

серотонина и его фермента в структурах мозга как в норме, так и в условиях ожирения различной этиологии.

**Теоретическое и практическое значение** диссертационной работы Е.В. Михайловой заключается в том, что полученные результаты необходимы для понимания интегративных взаимодействий исследованных систем, что чрезвычайно важно при нахождении путей их коррекции, в частности, в условиях метаболических нарушений.

**Анализ обоснованности и достоверности полученных данных.** Диссертационная работа Е.В. Михайловой написана хорошим языком, четко аргументирована и построена. Автором получен большой экспериментальный материал, который обработан с помощью различных современных, адекватных поставленным задачам методов и статистически грамотно проанализирован. Все это позволило диссертанту сформулировать выводы, которые в полной мере раскрывают цель исследования и отвечают на поставленные задачи.

**Соответствие диссертации и автореферата требованиям ВАК РФ.** Результаты диссертационного исследования опубликованы в 8 статьях из списка ВАК РФ, в том числе в международном издании, а также представлены на различных всероссийских и международных конференциях.

**Характеристика работы.** Диссертация Е.В. Михайловой построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст изложен на 146 страницах, содержит 8 таблиц и иллюстрирован 56 рисунками. Список использованной литературы состоит из 329 источников, в том числе 15 отечественных.

В обзоре литературы автор проанализировала классические представления и современные данные, демонстрирующие исследования меланокортиновой и серотониновой систем мозга, в частности в условиях развития метаболического синдрома, что и обосновывает заявленную автором цель настоящей работы - изучить молекулярные основы, обеспечивающие взаимосвязи между меланокортиновой и серотониновой системами мозга в норме, а также выявить изменения в этих системах при метаболических расстройствах различной этиологии.

Исследования проведены на лабораторных грызунах – мышах C57Bl/6J двух генотипов (a/a и Ay/a – Agouti yellow) и крысах Вистар. Если у мышей C57Bl/6J генотипа a/a и крыс Вистар развитие метаболических расстройств провоцировалось содержанием на высококалорийной диете (диета-индуцированное ожирение), то у мышей Agouti yellow

ожирение генетически обусловлено и развивается естественным путем (меланокортиновое ожирение). Таким образом этим сравнение изменений в исследованных системах мозга в различных моделях ожирения представляется интересным и важным в связи с возможностью существования видовых различий.

Автор дает подробное описание методов исследования, использованных реактивов, праймеров, антител, подготовки проб для анализа. В работе использованы современные методы исследования, которые адекватны поставленным задачам. Использован метод анализа экспрессии генов (метод ПЦР в реальном времени, сопряженный с обратной транскрипцией), анализ уровня белков с помощью Вестерн-блоттинга и иммуногистохимических методик на фиксированных срезах мозга (ДАБ-метод, двойное и одиночное иммуномечение с применением флуоресцентных меток). В работе использован имидж-анализ препаратов с помощью световой и конфокальной микроскопии с использованием специализированных программ, позволяющих провести количественный анализ изображения в клетках конкретной эргичности. Также в работе использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, дающий ответ о содержании непосредственно серотонина и его метаболита в ткани (в частности в гипоталамусе).

При выполнении диссертационного исследования Е.В. Михайловой получен большой экспериментальный материал. Автор демонстрирует возможность прямого влияния меланокортинов на серотонинергические нейроны мозга через различные рецепторные пути, а также возможность влияния серотонина на РОМС-нейроны через серотониновый рецептор 1В подтипа. Анализ уровня серотониновых рецепторов в РОМС-нейронах и меланокортиновых рецепторов в серотониновых нейронах на фоне сравнения с уровнем мРНК этих рецепторов в гипоталамусе и среднем мозге в условиях развития метаболических нарушений позволяет оценить вклад каждой из исследуемых систем в регуляцию уровня функциональной активности нейронов конкретной эргичности. Проведен анализ экспрессии различных генов меланокортинового и серотонинового ряда в гипоталамусе и среднем мозге при различных формах ожирения, что позволяет выявить видоспецифические особенности активности этих систем мозга. Получены интересные данные о механизмах компенсации, направленных на поддержание жизнеспособности нейронов (в частности серотонинергических нейронов дорзального ядра шва) при снижении их функциональной активности (уменьшение в них уровня триптофангидроксилазы-2 – фермента биосинтеза серотонина в мозге и самого серотонина). В частности, показана роль Akt1 – фермента семейства протеинкиназ В в серотонинергических нейронах среднего мозга, хотя ранее роль этого фермента изучали в

гипоталамических нейронах. Автор демонстрирует возможность экспрессии триптофангидроксилазы-2 непосредственно в нейронах гипоталамуса и усиление этих процессов при метаболическом синдроме, что, очевидно, является компенсаторным механизмом, направленным на поддержание баланса серотонина при данной патологии.

Большой объем данных посвящен исследованию меланокортинового рецептора 1-го типа в структурах мозга. Автор дает описание его распределения в различных нейронах гипоталамуса и, в частности, в POMC-нейронах, что дает основание предполагать его функцию и как ауторецептора, что может быть проявлением защитных свойств меланокортиновых пептидов и, в частности, основного агониста MC1R –  $\alpha$ -MSH.

В диссертации Е.В. Михайловой поставлен целый ряд вопросов, которые предстоит решить, что демонстрирует дальнейшие перспективы исследования интеграции меланокортиновой и серотониновой систем при метаболических нарушениях и, по-видимому, других патологиях.

**Вопросы и замечания.** После прочтения диссертационной работы Е.В. Михайловой остается приятное впечатление. Однако можно отметить некоторые замечания, которые, однако, не имеют принципиального значения.

Представленный автором обзор литературы довольно большой (начинается с 12-й страницы и в целом занимает 43 страницы). Автор очень подробно описывает различные компоненты меланокортиновой системы, а описание меланокортиновой системы мозга начинается с 32-й страницы. Можно было бы обойтись описанием непосредственно меланокортиновой системы мозга, что и является предметом исследования.

Анализ литературных данных позволяет заключить о существовании видовых особенностей меланокортиновой системы. В этом случае следовало бы отдельно подчеркнуть, какие именно различия известны между крысами и мышами, так как эти животные являются объектом исследования в настоящей работе.

Описание методов очень детализировано, описание общепринятых методов можно было бы и сократить. Инсулин глюкозотолерантный тест был проведен только у крыс. Нет обоснования, почему этого не было сделано у мышей.

В таблице 4 (С. 63) приводится разведение первичных антител к GAPDH 1:20 000, это действительно так?

Количество животных в группе не везде указано (с. 91 рис. 28).

Также при прочтении работы возникли вопросы, которые, скорее, носят дискуссионный характер:

1. Автор выбрал для исследования серотониновые рецепторы 1В-подтипа и 2С-подтипа, которые, согласно данным литературы и полученным им результатам, контролируют метаболизм и пищевое поведение. Почему при этом не уделено никакого внимания родственным им другим подтипам серотониновых рецепторов, которые также сопряжены с Gi-белками (5-HT<sub>1</sub>AR и др.) или с Gq/11-белками (5-HT<sub>2</sub>AR и др.), что известно об их участии в центральной регуляции энергетического обмена?
2. Анализируя пищевое поведение, диссертант сконцентрировал свое внимание на меланокортиновой системе, оценивая соотношение ПОМК и агути-подобного пептида. При этом хорошо известна ключевая роль в регуляции аппетита нейропептида Y, лептина и грелина, действие которых также реализуется через гипоталамические нейроны. Исследовал ли автор на своих метаболических моделях экспрессию этих факторов и их рецепторов в ЦНС и, если да, то какие были получены результаты?
3. Меланокортиновый рецептор 1-го типа очень похож по структурной организации на MC4R, тоже активируется альфа-меланоцитстимулирующим пептидом и сопряжен с Gs-белком и аденилатциклазой, так в чем же тогда принципиальная разница в сигнальных каскадах MC4R и MC1R, и через какие каскады MC1R может влиять на продукцию ПОМК? Есть ли здесь какие-то параллели с MC3R, другим ауторецептором?
4. У крыс при ДИО в гипоталамусе не выявлено изменений уровня Iba1 – маркера микроглии, в отличии от мышей ДИО16. Результаты получены различными методами (в первом случае – Вестерн блоттинг, во втором – флуоресцентное иммуномечение). Однако в гипоталамусе может быть перераспределение локализации микроглии. Есть ли у Вас какие-либо данные об этом у крыс при ДИО?

**Заключение.** Диссертационная работа Елены Викторовны Михайловой «МЕЛАНКОРТИНОВАЯ И СЕРОТОНИНОВАЯ СИСТЕМЫ ГИПОТАЛАМУСА И СРЕДНЕГО МОЗГА В НОРМЕ И ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ У МЫШЕЙ И КРЫС», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 – физиология и 03.01.04 – биохимия, является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором на основании самостоятельно выполненных автором экспериментов сформулированы и обоснованы

научные положения. По актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне, теоретическому и практическому значению полученных данных работа соответствует п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, ред. от 01.10.2018 г., с изменениями от 26.05.2020 г.), а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.03.01 - физиология и 03.01.04 - биохимия.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на совместном заседании кафедры нормальной физиологии с биофизикой и кафедры биологической химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения России, протокол № 3 от 12 января 2021 г.

Маслюков Петр Михайлович, д.м.н. профессор  
 Заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой  
 ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России  
 150000, Россия, Ярославль, ул. Революционная 5  
 Тел. +7(4852)30-57-63  
 Факс +7(4852) 72-91-42  
 Email mpm@ysmu.ru

Потапов Павел Петрович, д.м.н. профессор  
 Заведующий кафедрой биологической химии  
 ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России  
 150054, Россия, Ярославль, ул. Чкалова, д. 6/7,  
 Тел. +7(4852) 73-86-30  
 Факс +7(4852) 72-91-42  
 Email yarbiochimic@newmail.ru

Подпись Маслюков Петр Михайлович  
 заверяю. Уч. секретарь Сергей