

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Поликарповой Анны Вадимовны на тему: «Производные прогестерона, селективно взаимодействующие с его мембранными рецепторами, и их избирательные эффекты» по специальности 03.03.01 – «Физиология»

Диссертационная работа Поликарповой Анны Вадимовны посвящена поиску и исследованию эффектов производных прогестерона, избирательно взаимодействующих с мембранными рецепторами для этого стероида. До определенного времени считалось, что стероидные гормоны осуществляют свое действие исключительно через ядерные рецепторы. В настоящее время доказано существование мембранных рецепторов для многих стероидных гормонов (включая прогестины), сопряженных с G-белками, постулированное еще в 80-е годы прошлого века, в первом приближении исследованы их структура и опосредованные ими биологические эффекты. Они оказались достаточно широкими и включают в себя не только влияние на репродуктивную функцию, прогестины вовлечены также в канцерогенез, в регуляцию функции сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем. Влияние прогестерона на иммунный ответ давно предполагается на основе его физиологического действия, поскольку крайне важна его роль в процессах овуляции, имплантации бластоцисты и поддержании беременности, которую невозможно осуществить без влияния на иммунное состояние организма. Для изучения разнообразных биологических функций прогестерона необходимо иметь его аналоги, которые являются селективными антагонистами и агонистами исключительно мембранных рецепторов. Кроме того, существенное внимание в последние годы привлекает модулирующее влияние прогестеронов на иммунный ответ. Изучение механизма модулирующего действия прогестеронов может привести к созданию перспективных иммуномодуляторов. В связи с этим тема диссертационной работы Анны Вадимовны Поликарповой безусловно актуальна как в теоретическом, так и в прикладном аспекте.

Диссертационная работа Поликарповой А.В. написана по классической схеме и включает следующие главы: «Обзор литературы», «Материалы и методы», две главы, где представлены результаты исследования («Результаты: поиск производных прогестерона, селективно взаимодействующих с его мембранными рецепторами» и «Результаты: влияние выбранных аналогов на продукцию цитокинов иммунными клетками»), а также «Обсуждение результатов». В конце диссертации дано короткое «Заключение», «Выводы» и представлен «Список литературы», включающий 186 ссылок.

В обзоре литературы автор подробно описывает структуру и свойства изоформ ядерных рецепторов прогестерона, механизм функционирования, их локализацию и регуляцию активности, а также приводит данные о лиганд-связывающей специфичности этих рецепторов. Далее автор рассматривает данные о семействе мембранных рецепторов прогестина и адипонектина, сигнальных путях, идущих от рецепторов прогестерона, тканевом распределении и регуляции активности, а также известные данные о лиганд-связывающей специфичности мембранных рецепторов прогестерона. Далее автор подробно анализирует известные данные об иммуномодулирующих свойствах прогестина. Обзор написан очень хорошо, достаточно кратко и логично, он дает полную информацию о современном состоянии проблемы, которой занимается автор, и подготавливает читателя к пониманию полученных им результатов и их трактовки.

Единственным замечанием к обзору литературы является следующее. Диссертант подробно описывает различные виды мембранных рецепторов к прогестерону, однако забывает о еще одном важном рецепторе, связывающем прогестерон – Na,K-АТФазе. Этот фермент специфически взаимодействует с кардиотоническими стероидами, которые являются ингибиторами фермента. Установлено, что прогестерон также связывается с Na,K-АТФазой и ингибирует ее. В свою очередь изменение конформации Na,K-АТФазы при связывании кардиостероидов может, с одной стороны, индуцировать различные сигнальные каскады, а с другой - изменять внутриклеточное соотношение ионов Na и K, влияя,

таким образом на экспрессию генов. Эти эффекты могут вносить свой вклад в мембранные эффекты прогестерона.

В главе 2 «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе материалы, животные, линии клеток, а также методы проведения исследования. Очень хорошо воспринимаются в этой главе обоснование выбора той или иной модели исследования, это позволяет читателю понять логику проведения эксперимента. Впечатляет набор использованных диссертантом методов: это методы клеточной биологии, физиологические, биофизические, биохимические, иммунологические и молекулярно-биологические методы. Все это свидетельствует о чрезвычайно высоком уровне подготовки Поликарповой А.В. к экспериментальной работе в лаборатории. К достоинствам диссертации следует отнести также то, что методы достаточно подробно описаны, вследствие чего могут на основе описания легко использоваться другими экспериментаторами.

В первой части работы, результаты которой изложены в главе 3, был проведен поиск аналогов прогестерона, которые избирательно связываются с мембранными, но не связываются с его ядерными рецепторами. Для изучения связывающей способности мембранных и ядерных рецепторов прогестерона диссертантом был выбран изящный методический подход: использовались клетки, обладающие исключительно мембранными или ядерными рецепторами. Определение специфичности аналогов прогестерона к мембранным рецепторам проводилось на клетках линии VxPC3, которые характеризуются высокой экспрессией мРНК мембранных рецепторов прогестерона α и γ , и полным отсутствием экспрессии мРНК ядерных рецепторов. Чтобы получить доказательства, что в этих клетках экспрессируются соответствующие белки, первоначально был проведен иммуноблоттинг, который показал наличие всех трех изоформ мембранных рецепторов и отсутствие ядерных рецепторов для прогестерона.

После доказательства того факта, что в клетках линии VxPC3 экспрессируются исключительно мембранные рецепторы прогестерона, был проведен анализ сродства (аффинности) девяти аналогов прогестерона к этим

рецепторам и выявлены два стероидных соединения, характеризующиеся максимальным сродством именно к мембранным рецепторам. Эти стероидные соединения сочетают в своей структуре отсутствие 3-кетогруппы с наличием 19-гидроксигруппы (19-гидроксипрегн-4-ен-20-он и 19-гидроксипрегн-3-ен-20-он). И, наконец, была проверена специфичность исследуемых аналогов прогестерона по отношению к ядерным рецепторам. Для этой цели была использована цитозольная фракция из матки крыс, обладающая исключительно ядерными рецепторами. С использованием этой модели было показано, что выбранные аналоги прогестерона с наиболее высоким сродством к мембранным рецепторам практически не взаимодействуют с ядерными рецепторами. Эти соединения продемонстрировали также полное отсутствие как агонистической, так и антагонистической активности в отношении изоформы В ядерного рецептора, поскольку не оказывали влияния на его транскрипционную активность. Для выяснения этого Поликарпова А.В. использовала другую модель: дрожжевую систему *Saccharomyces cerevisiae*, содержащую одновременно экспрессионную и репортерную плазмиду pRR-PR-5Z, несущую ген ядерного рецептора прогестерона В человека и репортерный ген β -галактозидазы.

Вторая часть работы, результаты которой представлены в главе 4, посвящена изучению действия выбранных аналогов прогестерона на продукцию цитокинов. Этот раздел поражает объемом проведенной работы и тщательностью проведенного анализа. Диссертантом были исследованы эффекты прогестерона и его аналогов в нескольких концентрациях на экспрессию мРНК различных интерлейкинов в клеточных культурах Т-лимфоцитов Jurkat (Т-клеточная лейкемия человека), ТНР-1 (линия моноцитов), клетках линии K562 (лимфобласты от пациента с хроническим миелоидным лейкозом) и, наконец, – в мононуклеарных клетках 16 доноров (8 мужчин и 8 женщин).

Для всех клеточных линий (кроме K562) было показано стимулирующее или ингибирующее действие высоких концентраций прогестерона и значительной части его аналогов на экспрессию мРНК нескольких интерлейкинов (IL- β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10), для линии K562 было отмечено только снижение экспрессии

мРНК TGF- β . Большинство этих эффектов наблюдалось также на клетках доноров. У большинства доноров (за некоторым исключением) на продукцию интерлейкинов прогестерон и его аналоги действовали однонаправленно.

Однако эффекты прогестерона и его аналогов, могут, по-видимому, зависеть от иммунного статуса доноров: в некоторых случаях прогестерон и его аналоги действовали на клетки доноров различным (противоположным) образом, это касается, в частности, их влияния на экспрессию IFN γ и IL-10. По-видимому, окончательно этот вопрос можно решить при анализе значительно большего количества доноров, что не входило в задачи диссертанта.

В результате анализа полученных данных автор заключает, что на Т-лимфоцитах (линии Jurkat) прогестерон и два его аналога оказывают преимущественно противовоспалительное действие, в то время как на моноцитах (линия THP-1) – преимущественно провоспалительное. В мононуклеарных клетках доноров автор отмечает тенденцию к преобладанию провоспалительного ответа.

Работу Поликарповой А.В. характеризует тщательный статистический анализ данных и четкая и грамотная постановка контрольных экспериментов.

Результаты, полученные Поликарповой А.В. и представленные ею в диссертационной работе, характеризуются высоким уровнем достоверности. Помимо грамотной статистической обработки результатов, это касается также постановки разнообразных положительных и отрицательных контролей, выяснения наличия половых различий между ответами у доноров мужчин и женщин.

Для более реальной трактовки полученных данных Поликарповой А.В. было проверено связывание прогестерона и его аналогов с транскортином (белком, обеспечивающим транспорт стероидов в крови), а также установлено, что для трех интерлейкинов (IL-1 β , TNF α , IL-6) происходит не только изменение в уровне экспрессии мРНК, но и соответствующее изменение в уровне экспрессии белка.

Заканчивается диссертационная работа «Обсуждением результатов», где рассмотрена роль полученных данных в понимании роли прогестерона в иммунном ответе и дальнейшем возможном развитии исследований с использованием исследованных аналогов прогестерона, кратким «Заключением» и «Выводами».

Следует отметить, что «Выводы» диссертации, безусловно, четко обоснованы грамотной постановкой экспериментов, полученным набором экспериментальных данных и их тщательным анализом.

В то же время к диссертанту есть одно замечание.

1). Полученные Поликарповой А.В. данные о связывающей способности ряда аналогов прогестерона с его мембранными рецепторами позволяют предположить, каковы могут быть особенности структуры связывающего центра прогестерона в мембранном рецепторе и чем они отличаются от особенностей структуры того же центра в ядерном рецепторе. К сожалению, автор не использовал свои данные с этой целью и не высказал для предположения о различии в структурах этих центров связывания прогестерона.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.03.01 – «Физиология» по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Поликарпова Анна Вадимовна вполне заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности Физиология.

Лопина Ольга Дмитриевна,
ведущий научный сотрудник, профессор

Место работы и адрес работы: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биохимии

Телефон рабочий: (495)939-39-55, Адрес эл. почты рабочей: [REDACTED]

Специальность, по которой защищена диссертация оппонентом: 03.01.04 -
«Биохимия»

