

**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»**

Как известно, в плазматических мембранах компетентных клеток существуют рецепторы стероидных гормонов адипонектинового семейства, через которые стероиды осуществляют быстрые негеномные эффекты, приводящие впоследствии к модуляции транскрипционной активности в клетках. Причем изменение транскрипционной активности может быть не связано с активацией хорошо известных ядерных рецепторов стероидов, являющихся лиганд-зависимыми транскрипционными факторами, но обусловлено посттрансляционными изменениями ферментов, в свою очередь влияющих на имеющиеся в данной клетке факторы транскрипции. Оказалось, что действие прогестинов, осуществляемое через «новый» класс рецепторов, значительно отличается от их действия, опосредуемого классическими ядерными рецепторами, и в некоторых случаях приводит к противоположным эффектам. Наиболее ярким примером такого разнонаправленного действия представителя стероидных гормонов прогестерона, осуществляемого через разные классы рецепторов, являются его эффекты в миометрии матки. Активируя ядерные рецепторы, прогестерон способствует расслаблению миометрия, а через мембранные рецепторы способствует фосфорилированию легких цепей миозина, что приводит к сократительной активности клетки. Авторы, обнаружившие этот феномен, предположили, что именно сменой состава рецепторов прогестерона в матке может индуцироваться процесс родов у человека, у которого уровень этого гормона остается высоким, не снижаясь в конце беременности. Отсюда понятна необходимость детального изучения эффектов, вызываемых прогестероном через структурно иные рецепторные белки.

Поэтому цель данного исследования - поиск производных прогестерона, селективно взаимодействующих с его мембранными рецепторами и выявление их эффектов в разных клетках, чувствительных к действию прогестинов, в частности, в иммунных клетках, является современной и актуальной. Использование селективных лигандов позволяет изучить функции мембранных рецепторов, их роль в широком спектре эффектов прогестерона; а также оказывать узконаправленное действие на процессы, опосредуемые этими рецепторами.

Работа состоит из двух относительно независимых частей, которые логически связаны друг с другом. Для выявления селективных лигандов необходимо изучение специфичности связывания различных производных прогестерона с мембранными рецепторами и классическими ядерными рецепторами, то есть изучение особенностей лиганд-связывающего кармана этих разных классов рецепторов. Поэтому первая задача, которая стояла в работе – найти подходящий объект для изучения связывающих характеристик мембранных рецепторов и протестировать взаимодействие с этими рецепторами новых синтезированных производных прогестерона, сравнить с их сродством к ядерным рецепторам. Для решения этой задачи автор изучил, какие рецепторные белки содержатся в клеточной линии ВхРС3 аденокарциномы поджелудочной железы, в которой было показано высокое содержание мембранных рецепторов только на уровне экспрессии генов. Показав наличие белков мембранных рецепторов и отсутствие ядерных в изучаемых клетках, автор охарактеризовал параметры связывания обнаруженных рецепторов с основными классами стероидных молекул и сравнил их с литературными данными исследований связывающих характеристик мембранных рецепторов. По совокупности полученных данных был сделан вывод, что наблюдаемое в клетках ВхРС3 связывание прогестинов обусловлено искомыми рецепторами, поскольку из рецепторов прогестерона в них имеются только мембранные, и связывающие характеристики совпадают с таковыми мембранных рецепторов. Тестирование взаимодействия производных прогестерона, синтезированных И.С. Левиной, в

изученных клетках позволило диссертанту выявить два соединения, имеющих сродство к мембранным рецепторам, которое не было высоким, но, по-видимому, было достаточным для активирования изучаемых рецепторов (как было показано далее при изучении их эффектов). При этом соединения не связывались с ядерными рецепторами и не модулировали транскрипционную активность ядерного рецептора человека в модельной дрожжевой системе. Вторая часть работы была посвящена изучению действия прогестерона и обнаруженных в первой части диссертационного исследования соединений – селективных лигандов мембранных рецепторов, в иммунных клетках человека на продукцию ими различных цитокинов. Действие прогестинов на иммунную систему представляет большой интерес, поскольку участие различных мононуклеарных иммунных клеток показано и в регуляции функции желтого тела яичников, в дифференцировке эндометрия и в его восприимчивости к имплантации, а также в сохранении беременности. В работе использовались разные объекты исследования, что представляет особый интерес. Во всех использованных объектах исследования автор сам изучил состав рецепторов прогестерона, за исключением Т-лимфоцитов Jurkat, где он был изучен ранее. Мононуклеарные иммунные клетки в основной своей массе не содержали ядерных рецепторов прогестерона, но имели мембранные рецепторы двух субтипов альфа и бета. В серии проведенных экспериментов диссертант обнаружил действие высоких концентраций стероидов на продукцию целого ряда провоспалительных и противовоспалительных факторов в разных типах иммунных клеток. Для решения задач этой части работы автор использовал как метод, позволяющий определять экспрессию генов изучаемых цитокинов по уровню мРНК, так и иммуноферментный анализ для определения количества секретируемых белков. В результате работы было показано что прогестерон и его аналоги действуют очень неоднозначно на экспрессию одних и тех же генов и продукцию белков в иммунных клетках разных доноров и в разных типах таких клеток. Эффект гормонов в значительной степени определяется объектом действия, а именно, особенностями дифференцировки и типом клетки, составом

ее рецепторов. Наиболее важный результат работы Анны Вадимовны состоит в выявлении соединений, действующих через мембранные рецепторы прогестерона и не оказывающих эффектов, опосредуемых ядерными рецепторами, а также демонстрация эффективности этих соединений на клетках, содержащих изучаемые рецепторы. Соединения вызвали специфические эффекты, сходные с действием прогестерона, не только в клетках, где отсутствовали классические рецепторы, но и в моноцитах, где такие рецепторы имелись. Следовательно, и прогестерон, и его новые производные действовали на продукцию изучаемых факторов через мембранные рецепторы.

Диссертационная работа Поликарповой А.В. содержит 121 страницу текста, включает следующие разделы: оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, приложение и список цитируемой литературы. Диссертация содержит 8 таблиц и 33 рисунка. Список литературы включает ссылки на 187 источников. В приложении отражены результаты секвенирования продуктов ПЦР, проведенного для подтверждения соответствия получаемых в процессе реакции амплифицируемых фрагментов ДНК ожидаемым при подборе праймеров.

Обзор литературы описывает механизмы действия прогестинов через разные типы и подтипы рецепторов с описанием особенностей лиганд-связывающей активности ядерных и мембранных рецепторов, дает представление о других известных на настоящий момент сенсорах прогестерона и транспортном белке прогестерона в крови. Из этого описания можно получить полное представление о структуре изоформ ядерных рецепторов, их субклеточной локализации, регуляции экспрессии гормонами и тканевом распределении. В части обзора, касающейся лиганд-связывающих свойств этого класса рецепторов, информация представлена очень кратко, хотя литература на эту тему довольно обширна. Это может быть оправдано тем, что ядерные рецепторы не являются главным объектом интереса в данной работе, автору важно было показать главное отличие лиганд-связывающих карманов двух

различных классов рецепторов в отношении 3-кето группы стероидной молекулы. Затем идет подробное описание структуры мембранных рецепторов, их строения, локализации в клетке, участия вторичных внутриклеточных посредников в проведении сигнала к конечным мишеням и вариациям этих сигнальных путей в зависимости от типа клетки. Также описаны выявляемые конечные эффекты этих сигнальных путей на вызревание ооцитов рыб, на сократительную активность миомерия, пролиферацию и апоптоз опухолевых клеток, процесс капаситации и акросомной реакции сперматозоидов, понижение кровяного давления, натриуретический эффект. Заключают литературный обзор отдельные главы, посвященные действию прогестинов на иммунную систему. Описываются известные данные по экспрессии рецепторов прогестерона в разных иммунных клетках, противоречивость результатов исследований разных авторов по этому вопросу. Приводятся доказательства участия половых стероидов и конкретно прогестинов в модуляции иммунных функций как при аутоиммунных и инфекционных заболеваниях, так и в регуляции нормальных процессов, происходящих в репродуктивной системе с участием иммунных клеток - поддержании менструального цикла, овуляции, имплантации зародыша, сохранении беременности и в родовой деятельности. Показана реципрокная регуляция прогестероном воспалительных процессов при различных физиологических реакциях.

Обзор литературы свидетельствует о хорошей теоретической подготовке диссертанта. Он дает представление о современном состоянии исследований в данной области науки.

В следующем разделе диссертации подробно изложены все материалы и методы, использованные в работе. Были применены методы клеточной биологии и физиологии (работа на животных), а также различные биохимические и молекулярно-биологические методы: культивирование клеточных линий и первичной культуры моноклеарных клеток, выделяемых диссертантом из крови доноров; разные варианты радиолигандного анализа; трансформация дрожжевых клеток с последующим тестированием стероидов в отношении

регуляции транскрипционной активности ядерного рецептора; выделение РНК, ее обработка ДНК-азой и синтез кодирующей ДНК на РНК с помощью обратной транскриптазы, определение уровней изучаемых мРНК методом ПЦР в реальном времени; иммуноблотинг и иммуноферментный анализ. Применение данных методов адекватно и соответствует поставленным задачам.

В разделе результатов описаны полученные в работе данные, которые анализируются в следующей части диссертационной работы – обсуждении результатов. Результаты хорошо проиллюстрированы рисунками и таблицами, статистически обработаны, содержат подробные подписи, изложены четко и понятно. Основные положения, выносимые автором на защиту, и выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

Таким образом, можно заключить, что Анна Вадимовна выполнила поставленные перед ней в работе задачи. Выявлены селективные лиганды мембранных рецепторов прогестерона, не взаимодействующие с ядерными рецепторами и не модулирующие их транскрипционную активность. Обнаружены эффекты этих соединений во всех изученных иммунных клетках, их направленность совпадает с действием прогестерона в этих клетках. Результаты достоверны, так как они были подвергнуты статистической обработке, все они представлены в таблицах и рисунках. В автореферате отражено полностью главное содержание работы.

По результатам диссертационной работы опубликовано 5 статей в журналах, которые индексируются в базе данных Web of Science. Также они докладывались на российских и двух международных конференциях.

Замечаний по существу работ нет, но в порядке обсуждения имеются вопросы:

1. Каковы биохимические механизмы реализации влияния изученных стероидных аналогов прогестерона на мембранные прогестероновые рецепторы на уровне самой мембраны.
2. Влияют ли аналоги прогестерона на глюкокортикоидные рецепторы аналогично прогестерону?

Таким образом, диссертация Поликарповой Анны Вадимовны «Производные прогестерона, селективно взаимодействующие с его мембранными рецепторами, и их избирательные эффекты» 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.

Шимановский Николай Львович

**Должность, звание:** Заведующий кафедрой, профессор

**Место работы и адрес работы:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева

**Телефон рабочий:** (499)766-41-57

**Адрес эл почты рабочей:** [REDACTED]

**Специальность, по которой защищена диссертация оппонентом:**  
14.00.25 - «Фармакология, клиническая фармакология»

Подпись профессора Шимановского Николая Львовича «удостоверяю»

Ученый секретарь РНИМУ им. Н.И. Пирогова

д.м.н. доцент Ольга Юрьевна Милушкина

117997 г. Москва, ул. Островитянова, дом 1, Тел.: (495) 434-14-22; E-mail:

[rsmu@rsmu.ru](mailto:rsmu@rsmu.ru)

