

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Сухаревой Екатерины Викторовны** "Особенности регуляции глюкокортикоидами ключевого фермента синтеза катехоламинов - тирозингидроксилазы мозга крыс в раннем онтогенезе", представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 - физиология

Исследование механизмов действия глюкокортикоидов на развивающуюся ЦНС является **актуальной** темой для науки и медицинской практики, поскольку препараты глюкокортикоидов достаточно широко применяются в перинатальной медицине. Изучением явления так называемого «онтогенетического программирования», когда условия протекания перинатального онтогенеза определяют долговременные и даже постоянные изменения в организме, в частности в нейрохимических системах мозга и регулируемых ими разных форм поведения, занимаются в мире крупные научные центры. Но механизм, обеспечивающий онтогенетическое программирующее действие глюкокортикоидов, остается далеким от полного понимания. Исследованию возможности реализации неканонического механизма действия глюкокортикоидов в головном мозге крыс в раннем онтогенезе и выяснению роли белков транскрипционного комплекса AP-1 в регуляции глюкокортикоидами экспрессии ключевого фермента синтеза катехоламинов - тирозингидроксилазы, посвящена диссертационная работа Сухаревой Е.В.

Основные научные результаты, представленные в работе, обладают **научной новизной**. Автором впервые установлено, что в основе зависимой от возраста регуляции глюкокортикоидами экспрессии тирозингидроксилазы лежит активация неканонического механизма действия гормона, которая обеспечивается преобладанием количества транскриптов и белков Jun над Fos, а также большей степенью взаимодействия белков JunB с AP-1 элементом промотора гена тирозингидроксилазы в перинатальном онтогенезе.

Также впервые выявлена глюкокортикоидная индукция тирозингидроксилазы в мозге 3-дневных животных и показано, что последствия гормонального воздействия на экспрессию тирозингидроксилазы в этот «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза сохраняются в ювенильном и взрослом возрасте и следовательно оставляют длительный след на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни

**Теоретическая и практическая значимость** проведенного исследования не вызывает сомнений. Представленные данные расширяют представление об участии глюкокортикоидов в процессах «онтогенетического программирования» медиаторных систем мозга. Результаты важны для понимания механизма регуляции глюкокортикоидами ключевого фермента синтеза катехоламинов тирозингидроксилазы в критические периоды раннего онтогенеза. В работе получены доказательства функционирования неканонического механизма глюкокортикоидной регуляции нейрогена и участия белков транскрипционного комплекса AP-1 в гормональной индукции гена тирозингидроксилазы. Показанные в работе последствия гормонального воздействия в «глюкокортикоид-чувствительный» период перинатального онтогенеза на длительную экспрессию ключевого фермента синтеза катехоламиновых нейротрансмиттеров важны для практической медицины, так как использование глюкокортикоидов в перинатальном периоде может повлиять на нейрохимию головного мозга в последующие периоды жизни.

**Содержание** диссертации Сухаревой Е.В., изложенной на 131 страницах машинописного текста, традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 320 ссылок. Работа содержит 17 рисунков и 3 таблицы.

Во введении обоснована актуальность проблемы и сформулирована цель настоящего исследования и конкретные задачи.

В обзоре литературы прежде всего представлены современные данные о глюкокортикоидах и механизмах их действия на экспрессию гормон-зависимых генов, подробно описаны канонический механизм действия глюкокортикоидов с участием глюкокортикоидного рецептора и неканонический механизм, реализуемый за счет белок-белкового взаимодействия. Затем рассмотрен аспект, касающийся особенностей структуры AP-1 комплекса, входящих в его состав белков, их экспрессия. Затем достаточно подробно рассмотрены и обобщены существующие на сегодняшний день литературные данные о тирозингидроксилазе мозга и ее регуляция глюкокортикоидами. Из критически рассмотренных в обзоре литературных данных является автор заключает, что изменение экспрессии глюкокортикоидами тирозингидроксилазы и других генов, лишенных GRE, за счет белок-белкового взаимодействия глюкокортикоидного рецептора с AP-1 транскрипционным фактором, может быть возможным путем их вовлечения в глюкокортикоид-зависимое «онтогенетическое программирование». И этим заключением автор обосновывает необходимость анализа до сих пор неясного функционирования этого механизма в критические сроки формирования мозга.

Методы, используемые в работе включают в себя современные молекулярно-биологические методы исследования. Это выделение РНК из экспериментального материала, получение кДНК и определение уровня мРНК изучаемых генов методом ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan, иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга, иммунопреципитация хроматина для выявления белок-белковых взаимодействий. Подробно описана экспериментальная модель, указано, какими были воздействия и с какой целью они были предприняты. Этот раздел написан четко и ясно и при необходимости методы могут быть легко воспроизведены.

Результаты исследования изложены в логической последовательности как этапы, когда результат этапа определяли задачу для следующего этапа. Экспрессия белков Jun и Fos, образующих AP-1 комплекс, а также тирозингидроксилазы исследована как на уровнях мРНК, так и белка и образования функционального

транскрипционного комплекса AP-1 с дистальным элементом промотора в гене тирозингидроксилазы.

Первый этап работы, связанный с исследованием перинатального онтогенеза транскриптов генов, образующих AP-1 комплекс - генов семейств Jun и Fos, выявил специфические закономерности экспрессии для каждого из исследованных транскриптов в перинатальном и раннем онтогенезе, которые свидетельствовали о преобладании в мозге плодов белков семейства Jun, по сравнению с Fos, что согласно неканоническому механизму действия гормона, может способствовать проявлению гормональной индукции экспрессии глюкокортикоид-зависимых генов.

Особое внимание было уделено возрасту крысят в 3 дня, поскольку для этого возраста факт зависимости экспрессии гена тирозингидроксилазы от уровня глюкокортикоидов не был известен. Представленные результаты доказали, что чувствительность тирозингидроксилазы к гормональной индукции не ограничена пренатальным периодом онтогенеза и сохраняется в первые дни жизни. При этом действие дексаметазона на соотношение экспрессии генов раннего ответа (Jun и Fos) зависит от отдела неонатального мозга.

В целом результаты исследования экспрессии генов и белков раннего ответа в период, когда ген тирозингидроксилазы может откликнуться на индукцию гормоном, экспрессия генов и белков семейства Jun выше уровня экспрессии генов и белков семейства Fos как интактном состоянии, так и при действии дексаметазона. Именно такое соотношение между экспрессией этих белков, согласно неканоническому механизму действия глюкокортикоидов, приводит к индукции гормон-зависимых генов. Увеличение же экспрессии Fos к 8 дню жизни может являться основной причиной независимости тирозингидроксилазы от уровня глюкокортикоидов в этом возрасте.

На следующем этапе исследования была определена степень взаимодействия белков Jun и Fos с AP-1 элементом промотора гена тирозингидроксилазы в периоды разной чувствительности к гормону (возраст 3 и 8 дней). Результаты показали, что глюкокортикоидная индукция тирозингидроксилазы осуществляется через белок-

белковое взаимодействие активированного гормоном рецептора с транскрипционным фактором AP-1, образованным преобладающими в мозге 3-дневных крысят белками семейства Jun.

И, наконец, была исследована продолжительность глюкокортикоидной индукции тирозингидроксилазы после введения дексаметазона на 3 день жизни. Результаты показали, что гормональная индукция в чувствительный период раннего постнатального онтогенеза способна долговременно сохранять повышенный уровень мРНК и белка фермента и таким образом модифицировать активность нейромедиаторной системы и обеспечивать изменения в регуляции медиаторной системы взрослого организма.

Для полноты картины не хватает, пожалуй, исследования (или ссылки на такое исследование других авторов), показавшего, какие изменения поведения и реакции на стресс наблюдаются у взрослых животных с повышенной активностью тирозингидроксилазы. Это можно отнести как к **замечанию**, так и к пожеланию.

Выводам, следующим из представленных результатов, предшествует хорошо написанное обсуждение, позволяющее оценить логичность ставившихся задач, направленных на достижение цели – определить роль белков транскрипционного комплекса AP-1 в регуляции глюкокортикоидами экспрессии ключевого фермента синтеза катехоламинов - тирозингидроксилазы в головном мозге крыс в раннем онтогенезе.

Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации являются достаточно обоснованными, адекватны результатам исследования и хорошо аргументированы. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Представленные в диссертации материалы опубликованы в научной периодической печати (4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 15 иных печатных работ) и докладывались на отечественных и международных научных форумах.



## Заключение.

Диссертация Сухаревой Екатерины Викторовны представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для современной физиологии – реализации неканонического механизма действия глюкокортикоидов в головном мозге крыс в раннем онтогенезе и выяснению роли белков транскрипционного комплекса AP-1 в регуляции глюкокортикоидами экспрессии ключевого фермента синтеза катехоламинов. Это важно для понимания механизма функционирования глюкокортикоид-зависимого «онтогенетического программирования» в критические сроки формирования мозга.

По актуальности темы, полноте поставленных и решенных задач, совокупности новых научных результатов, и научно-практической значимости, полноте изложения материала в рецензируемых печатных научных изданиях диссертационная работа Сухаревой Е.В.. отвечает требованиям ВАК России, предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата наук (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.01 – физиология

Зав. лабораторией биохимии чужеродных соединений

ФГБНУ НИИ молекулярной биологии и биофизики,

доктор биологических наук, профессор

Гришанова А.Ю.

11 ноября 2016 г.

Личную подпись Гришановой А.Ю. заверяю  
Начальник отдела кадров НИИМББ  
"11" ноября 2016 г. подпись

