

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук Чистякова Дмитрия Викторовича на тему “Омиксные подходы в изучении взаимосвязи профиля оксипинов с изменениями системы врожденного иммунитета: клеточные модели и заболевания человека” по специальностям 1.5.8. - Математическая биология, биоинформатика 1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия**

### **Актуальность выбранной темы**

Диссертация Д. В. Чистякова посвящена важной проблеме изучения связи активации систем врожденного иммунитета и низкомолекулярных липидных медиаторов воспаления. Развитие современных методов масс-спектрометрического анализа позволило по-новому взглянуть на роль оксипинов, окисленных производных полиненасыщенных жирных кислот, как в клеточном ответе на провоспалительные стимулы, так и на их изменение при хронических неинфекционных заболеваниях. Фокус работы на изучении профиля оксипинов, производных полиненасыщенных жирных кислот, обусловлен их важнейшей ролью в регуляции воспаления, способностью при передаче сигнала связываться как с собственными специфическими рецепторами, так и с различными транскрипционными факторами, влияя на экспрессию различных генов, вовлеченных в воспалительный ответ и процессы окислительного стресса.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа состоит из традиционных разделов: введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), выводов и списка литературы. В конце работы представлено приложение. Работа изложена на 304 страницах машинописного текста.

Библиографические ссылки включают 466 источника современной научной литературы.

Во введении, занимающем 11 страниц, автор обосновывает выбор темы исследования и ее актуальность. Представлена степень разработанности темы, описаны цели и задачи исследования. Отражены апробация материалов и публикации по материалам диссертации, сформулированы ключевые положения.

Обзор литературы изложен на 45 страницах и включает 5 разделов. Описаны ферментативные пути биосинтеза оксилипинов (циклооксигеназный, липоксигеназный, монооксигеназные пути, путь биосинтеза анандамида и неферментативный путь биосинтеза оксилипинов). Рассмотрены мультиомиксные подходы к изучению различных заболеваний человека с акцентом на исследование профиля оксилипинов при различных нозологиях. Выделены разделы, описывающие профили оксилипинов при онкологических и неврологических заболеваниях. Представлено современное представление о связи врожденного иммунитета и воспаления. Рассмотрена роль оксилипинов как активных участников воспалительного ответа. Описаны клеточные модели изучения механизмов воспалительного ответа с фокусом на астроцитах —важных участниках острых и хронических патологических состояний. Также описаны клеточные модели адаптации, такие как адаптация клеток к повышенной концентрации глюкозы, действию гиалуроновой кислоты и адаптация к низким концентрациям эндотоксинов. В отдельном разделе рассмотрены синтетические лиганды ядерных рецепторов PPAR и их роль в регуляции воспаления. Всесторонний анализ данных научной литературы позволил Чистякову Д.В. обосновать в заключении обзора цель и задачи исследования.

В разделе “Материалы и методы” приведено подробное описание используемых методик, включая метод масс-спектрометрии для детекции оксипинов, методы, используемые в *in vitro* исследованиях, такие как определение скорости деградации мРНК, выделение первичных астроцитов крыс, а также биоинформатические подходы (метод случайного леса, метод анализа экспрессии генов), используемые в работе.

В главе “Результаты и обсуждение” последовательно представлены результаты экспериментов, их обсуждение, интерпретация и сопоставление с уже известными в литературе данными. Результаты проведенных экспериментов представлены на 100 рисунках в графическом виде и в 27 таблицах. В первом разделе, посвященном изучению молекулярных механизмов клеточного ответа при активации Толл-подобных рецепторов и изменению профиля оксипинов, был охарактеризован клеточный ответ астроцитов на действие различных провоспалительных стимулов. Оценивались: 1) уровень высвобождения цитокинов, ПНЖК (полиненасыщенных жирных кислот) и оксипинов во внеклеточную среду; 2) изменения на уровне внутриклеточных сигнальных путей (экспрессия, фосфорилирование киназ); 3) влияние таких факторов, как пол животного и концентрация сыворотки в среде культивирования, на воспалительный ответ. Для всех тестируемых обработок различными агонистами было показано наличие провоспалительного профиля как в синтезе оксипинов, так и в контексте активации митоген-активируемых протеинкиназ и изменений в уровне экспрессии генов. Впервые был детально охарактеризован профиль оксипинов при краткосрочной (4 ч) и долговременной (24 ч) стимуляции астроцитов LPS. В серии исследований по влиянию пола животного на клеточный ответ астроцитов было показано, что пол животных имеет значение, различия в ответе включают не только цитокины, но и метаболизм арахидоновой кислоты, указывая на важность

учета полового диморфизма при анализе эффектов этих молекул и родственных противовоспалительных веществ как *in vitro*, так и *in vivo*. В астроцитах, выделенных у самок, наблюдался более выраженный синтез IL-10, который относят к факторам разрешения воспаления. Полученные результаты имеют важное методологическое значение. В большинстве исследований не указывают пол животных, из которых выделяют первичную культуру. Автор делает на этом акцент и в дальнейших работах использует смешанную культуру клеток, выделяемых как из самцов, так и самок.

Следующий раздел результатов посвящен посттранскрипционным механизмам регуляции воспаления за счет изменения времени жизни мРНК провоспалительных генов. Исследовались два белка — тристетрапролин (TTP) и человеческий антиген R (HuR), которые участвуют в деградации и стабилизации мРНК соответственно. Данная система была впервые детально охарактеризована в астроцитах. Показано, что регуляция TTP происходит за счет изменения его экспрессии и накопления в ядре, в то время как HuR осуществляет свою регуляцию за счет изменения внутриклеточной локализации.

Большой раздел работы посвящен изучению ответа астроцитов на провоспалительные стимулы при различных клеточных адаптациях. В серии экспериментов моделировали на клеточном уровне: 1) влияние гипергликемии, 2) влияние эндотоксинового хронического воспаления, 3) воздействие противовоспалительных цитокинов, 4) изменения внеклеточного матрикса при воспалении. Эти модели позволили охарактеризовать профили оксилипинов и изучить изменения воспалительных ответов астроцитов при адаптациях. Результаты, полученные в ходе экспериментов с различной концентрацией глюкозы и сыворотки в клеточной среде, имеют важное методологическое значение. Было получено, что пониженная концентрация сыворотки в среде

культивирования приводит к более выраженному воспалительному ответу при стимуляции клеток LPS. Адаптация клеток к различным концентрациям глюкозы не влияет на синтез провоспалительного цитокина IL-6, при этом меняется профиль оксипинов, т.е. нарушается работа ансамбля клеточного ответа на провоспалительный стимул (соотношение между высвобождаемыми цитокинами и оксипинами). Таким образом можно отметить, что при изучении механизмов клеточного сигналинга следует учитывать содержание в среде как глюкозы, так и сыворотки, уделяя особое внимание протоколам, подразумевающим смену среды на бессывороточную или с низким процентом сыворотки.

Несмотря на то, что в 2021 году концепция “поляризации” астроцитов была пересмотрена, и в общем виде считается, что у астроцитов нет выраженных A1 и A2 состояний, изучение действия “поляризационных” агентов вносит важный вклад в понимание механизмов клеточного ответа в ходе активации врожденного иммунитета. В серии экспериментов с обработкой астроцитов классическим провоспалительным стимулом LPS и интерлейкином-4 было установлено, что наблюдается преобладающее участие  $\omega$ -6 ПНЖК и COX-пути для классической адаптации и  $\omega$ -3 ПНЖК и LOX-пути для альтернативной адаптации астроцитов. Также впервые было охарактеризовано изменение профиля оксипинов в модели толерантности к эндотоксину, то есть при действии низких доз липополисахарида.

В следующем разделе результатов в серии экспериментов с низкомолекулярными соединениями было показано, что профиль оксипинов можно модулировать с помощью низкомолекулярных ингибиторов, снижая концентрацию провоспалительных метаболитов и повышая количество соединений, ускоряющих завершение воспалительного ответа. Данные эффекты были хорошо проиллюстрированы на примере шести агонистов и антагонистов ядерных

рецепторов PPAR, при этом было показано, что лиганд рецептора PPAR $\beta$  - GW501516 демонстрирует наиболее перспективные результаты, не только оказавшись лучшим из лигандов по цитокиновому индексу (соотношению IL-10/TNF $\alpha$ ), но и стимулируя синтез молекул разрешения воспаления – производных докозагексаеновой кислоты.

Следующий большой раздел результатов был посвящен клиническим исследованиям с анализом профилей оксипинов. Было сделано предположение, что профиль оксипинов может быть характеристической подписью при различных заболеваниях, имеющих воспалительную компоненту. Были проведены эксперименты с такими заболеваниями, как болезнь Вильсона-Коновалова, болезнь Паркинсона (совместно с научным центром неврологии), рак молочной железы (совместно с МНИОИ им. П.А. Герцена) и первичная открытоугольная глаукома (совместно с НМИЦ имени Гельмгольца). Для каждого заболевания был получен набор оксипинов, отличающий больных от здоровых. В экспериментах с болезнью Паркинсона анализ крови больных позволил не только отделить пациентов от здоровых контролей, но и выявить стадию болезни. Анализ полученных профилей позволил предположить, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов для пациентов с поздними стадиями болезни Паркинсона может иметь положительный терапевтический эффект. На следующем этапе в работе рассматривался профиль оксипинов в образцах пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Анализ внутриглазной жидкости (ВГЖ) выявил увеличение концентрации цитотоксичных соединений Lyso-PAF и 12,13-DiHOME, так же как маркеров клеточного стресса, метаболитов линолевой кислоты HODE/KODE. Получение схожих липидных профилей как в ВГЖ, так и в слезах открывает потенциальную возможность ранней диагностики глаукомы. Применение современных ингибиторов эпоксидгидралазы для

снижения цитотоксического эффекта 12,13-DiHOME может быть эффективным дополнением к терапии глаукомы.

В масштабном исследовании профиля оксипинов у 152 здоровых добровольцев и 169 пациентов с раком молочной железы было показано статистически значимое изменение 18 метаболитов: повышение концентрации COX-производных арахидоновой кислоты, снижение LOX-производных и CYP-производных метаболитов, вместе со значительным снижением концентрации анандамида (AEA). Данные результаты отражают уникальный профиль пациентов с ранней стадией РМЖ, что в перспективе может использоваться для ранней диагностики данного заболевания. Также было проведено сопоставление транскриптомных профилей образцов крови и тканей пациентов с РМЖ, взятых из публичных баз данных, и данных о профиле оксипинов. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов показывает, что образцы опухолевой ткани или клетки крови пациентов с РМЖ имеют свой собственный паттерн экспрессии генов метаболизма оксипинов. При этом эти изменения не коррелируют напрямую с изменениями профиля оксипинов в плазме крови. Полученные результаты ложатся в основу будущих экспериментов и ответов на вопросы: отражают ли изменения оксипинов стадии рака или специфические защитные реакции организма? Являются ли наблюдаемые изменения защитой от нарушения гомеостаза при заболевании или проявлением патологии? Ответы на эти вопросы будут влиять на выбор терапевтических стратегий.

В заключении обобщены основные результаты работы. Интерпретация представленных материалов обосновывает положения, выносимые на защиту, и подводит к выводам работы. Выводы диссертации обоснованы полученными результатами и соответствуют поставленным в работе задачам.

## Степень научной новизны результатов и обоснованности положений диссертации, выносимых на защиту

В ходе выполнения диссертационного исследования был собран значительный массив экспериментальных данных, касающихся изменений профиля оксипинов как в условиях *in vitro* в контексте нейровоспалительных процессов, так и *in vivo* в рамках клинических исследований различных патологий. Описаны изменения внутриклеточных сигнальных путей, выявлены ключевые митоген-активируемые протеинкиназы, участвующие в передаче сигнала. Разработаны модели клеточной адаптации к воздействию цитокинов, увеличенной концентрации глюкозы и изменениям в составе внеклеточного матрикса. Проведен анализ различных низкомолекулярных соединений, представляющих интерес в качестве модуляторов профиля оксипинов. Исследования, проведенные на пациентах и здоровых добровольцах, продемонстрировали, что профиль оксипинов имеет характерные особенности для различных заболеваний. Применение транскриптомных подходов и методов машинного обучения позволило выявить группу генов-мишеней, изменяющихся при раке молочной железы.

В процессе исследования молекулярных механизмов клеточного ответа на воспалительные стимулы впервые было осуществлено комплексное изучение глиальных клеток, охватывающее анализ изменений в синтезе цитокинов, экспрессии генов маркеров воспаления, а также профиля оксипинов и других показателей воспалительного ответа. Впервые было продемонстрировано, как длительная адаптация клеток к низким дозам LPS, цитокинам IL-4 и IL-10 влияет на клеточный ответ при активации Toll-подобного рецептора 4. С применением методов масс-спектрометрии впервые был охарактеризован синтез оксипинов при адаптации клеток к повышенному уровню глюкозы; установлено, что



продолжительная адаптация клеток способствует формированию толерантности к провоспалительным сигналам. На широком спектре соединений была продемонстрирована возможность целенаправленной модификации профиля оксипинов с использованием низкомолекулярных соединений, включая как действующие лекарственные средства, так и перспективные молекулы, находящиеся на различных этапах клинических и доклинических испытаний.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертация Чистякова Д.В. имеет не только потенциал в области фундаментальной науки, расширяя наше понимание внутриклеточных молекулярных процессов при активации систем врожденного иммунитета на клеточном уровне, но и потенциальное практическое значение с точки зрения поиска новых путей, которые могут быть целью фармакологических препаратов для терапии заболеваний с воспалительной компонентой, а также разработки эффективных биомаркеров заболеваний.

### **Достоверность результатов исследования**

Использованные в работе объекты и методы, а также методы статистической обработки результатов выбраны корректно. Достоверность полученных данных не вызывает сомнения. Текст диссертации соответствует установленным правилам научного цитирования, библиографические ссылки оформлены корректно. По своему содержанию диссертационное исследование соответствует заявленным специальностям 1.5.8. - Математическая биология, биоинформатика и 1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия. Основные идеи и положения диссертационной работы отражены в научных публикациях, и представлены на международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 22 статьи в

международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus (из которых 21 публикация входит в Q1-Q2 квартили) и 21 тезис в сборниках докладов научных конференций. В большинстве работ Д.В. Чистяков является первым автором, что свидетельствует о его значительном личном вкладе в получение данных, представленных в публикациях. Публикации соответствуют теме диссертационного исследования и раскрывают его основные положения.

### **Замечания и вопросы по диссертации**

Несмотря на высокий методический научный уровень, работа не лишена определенных недостатков:

1. В работе имеется некоторое количество опечаток, описок.

Например:

Стр. 39 «Например, в работе [94] при анализе профиля из 20 оксипинов в плазме пациентов с БАС выявили снижение 7 метаболитов, из них 4 производных производных LA (9-HODE, 13-HODE, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME), 2 метаболита AA (5-HETE, 11-HETE) и 1 метаболита DHA (14-HDoHE)».

Стр. 61 «Являясь ключевым регулятором врождённой иммунной системы, связь между рецепторами PPAR и TLR была предложена в качестве потенциально терапевтического мишени в борьбе с заболеваниями [239]».

Стр. 65 «Для получения астроцитов в экспериментах с отдельным выделением из самцов и самок проводили генотипирование использовали материал от каждого из щенков».

Стр. 68 «...а интенсивность люминесценции рассчитывали с помощью программного обеспечения программного обеспечения QuantityOne (Bio-Rad, США) ImageLab 3.0 (Bio-Rad, США)...».

Стр. 70 «Далее образы растворялись в 100 мкл безводного метанола, переносились в вials для ВЭЖХ и хранили при температуре -80 °С до дальнейшего анализа концентрации оксипинов».

Стр. 74 «Модель случайного леса RandomForest [243] была построена с использованием пакета R RandomForest [244]».

2. На рисунке 3.13 отсутствуют репрезентативные результаты вестерн-блоттинга с использованием первичных антител против белка, количество которого не должно изменяться при любых воздействиях на клетку. Как производилось выравнивание количества наносимого белка на электрофорез?

3. В главе «Материалы и методы» в разделе 2.2.16 указано, что статистическая значимость данных проверялась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим posthoc тестом Бонферрони. На мой взгляд, в ряде случаев (например, рис. 3.8, рис 3.9, рис. 3.10), следует использовать two-way ANOVA анализ, который позволяет установить одновременное влияние двух факторов, а также взаимодействие между этими факторами. Так, например, на рис. 3.8 рассматривается влияние пола и острого воспаления.

### **Заключение**

Высказанные замечания не снижают актуальность и значимость проведенного автором исследования, и носят дискуссионный характер. По своей значимости, актуальности и уровню выполнения исследования диссертационная работа Д.В. Чистякова отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова, предъявляемым к работам подобного рода. Содержание

диссертации соответствует паспортам специальностей 1.5.8. - “Математическая биология, биоинформатика” и 1.1.10 - “Биомеханика и биоинженерия” по биологическим наукам, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 “Положения о присуждении ученых степеней”), а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Таким образом, соискатель Чистяков Дмитрий Викторович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.8. - “Математическая биология, биоинформатика” и 1.1.10 - “Биомеханика и биоинженерия”.

Пустыльняк Владимир Олегович

Заведующий лабораторией молекулярной патологии института медицины и медицинских технологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет». д.б.н., доцент



11.11.2024

Индекс, почтовый адрес места работы: ул. Пирогова, 1, Новосибирск, 630090  
Рабочий e-mail, рабочий телефон:  
[pustylvnyak@post.nsu.ru](mailto:pustylvnyak@post.nsu.ru), (383)363-40-08

Подпись Пустыльняка В.О. заверяю

Ученый секретарь I



Е.А. Тарабан