

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы диссертационного исследования

Представленная к защите диссертационная работа Чистякова Д.В. посвящена изучению клеточных регуляций с участием оксипинов. Последние десятилетия изучение различных типов межклеточных коммуникаций составляет предмет интереса тысяч биологов, а в силу важности для развития патологических процессов, и медиков по всему свету. Существование организма и развитие любого процесса в нем обеспечивается при одновременном регулирующем воздействии множества различных регуляторных молекул. Наверное, наиболее яркие эффекты связаны с гормонами и цитокинами, но в реальности, число разнообразных классов молекул намного больше, и развитие любого процесса зависит от суммарного воздействия всех этих молекул.

В диссертации рассматриваются эффекты оксипинов - достаточно большой группы сигнальных молекул. Оксипины многочисленны, но концентрации их невелики. Изучение таких сигнальных молекул поодиночке достаточно малопродуктивно, использование омиксных подходов для их изучения позволяет точнее описать эффекты оксипинов. Именно при таком анализе, т.е. анализ групп молекул, а не выбранной молекулы, удается лучше выявлять возможные эффекты.

Естественно, не одна работа не может строиться в отрыве от определенных биологических явлений, применительно к которым проводится изучение. В диссертации рассматриваются некоторые заболевания, но большая часть работы построена на изучении астроцитов, много внимание уделяется возможным эффектам астроцитов в ходе нейровоспаления. Эта модель крайне интересна, так как протекающие в нервной ткани воспалительные процессы принципиально отличаются от классического воспаления. В последние годы интерес к процессам в нервной ткани крайне высок, что оправдано как с биологической, так и с медицинской точки зрения. Таким образом, актуальность исследования несомненна.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Описания материалов и методов исследования, Результатов, Обсуждения полученных данных, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 304 страницах, содержит 27 таблиц, 100 рисунков и 5 приложений. Список литературы включает 466 источников.

Введение содержит все необходимые формальные элементы, а также достаточно подробное описание проблемной области и поставленных в работе задач. Обзор литературы

демонстрирует хорошее владение материалом. Обращает внимание, что автор достаточно гибко использовал этот раздел для введения необходимых понятий и тем. Так, первая часть обзора содержит чрезвычайно конденсированную, сухо написанную характеристику оксипиринов и путей их синтеза. Из этой части автор делает несколько выводов, которые дают представление о видении автором проблемной области. Последующая (большая) часть раздела литературы уточняет, конкретизирует и развивает эти выводы. Такой несколько необычный способ организации обзора литературы. Много места в обзоре литературы уделяется методическим вопросам, что также оправдано, так как любое сложное исследование сильно зависит от используемых методов. Автор делает упор на использование омиксных технологий, поэтому дополнительное описание чисто методических вопросов кажется оправданным.

Раздел Материалы и методы написан с необходимой детализацией.

Результаты работы делятся на три части. Первая часть “Изучение молекулярных механизмов клеточного ответа на активацию Толл-подобных рецепторов (TLR) и изменение профиля оксипиринов” посвящена изучению клеточных реакций в *in vitro* модели нейровоспаления, а еще точнее, в первичной культуре астроцитов. Результаты приводятся очень последовательно (при этом автор указывает статьи, в которых опубликованы результаты того или иного эксперимента). В ходе этой части исследования автор изучал высвобождения во внеклеточную среду цитокинов, ПНЖК и оксипиринов, а также изменения уровня экспрессии и/или активности маркеров внутриклеточных сигнальных путей. Это исследование кажется достаточно традиционным, необычность связана с комплексностью проведенного исследования (хотелось бы отметить крайне удачные схемы, на которых сводится как все изучаемое поле, так и методы, которые затем используются в ходе проведения экспериментов). Проведенное исследование ответов астроцитов в культуре при активации TLR-сигнального пути позволила соотнести высвобождение провоспалительных цитокинов с высвобождением полиненасыщенных жирных кислот и образующихся из них оксипиринов, получить характеристики изменений внутриклеточных регуляторных путей (MAPK, PPAR, NF- κ B).

Далее автором была проведена оценка влияния на клеточный ответ пола животных, из которых получены клетки, процессов деградации мРНК на провоспалительные маркеры, концентрации сыворотки в среде культивирования. Оказалось, что астроциты, полученные от мужских и женских особей, по-разному реагируют на действие LPS на уровне выработки цитокинов и простагландинов. Кроме того, автор показал, что трилостан (ингибитор 3β -гидроксистероиддегидрогеназы) проявляет противовоспалительные свойства в астроцитах, полученных от самок. В целом, эти результаты очень интересны, было бы интересно продолжить эти эксперименты с использованием животных.

Также очень интересны данные, касающиеся регуляции TLR4-стимулированного ответа астроцитов, путем изменения скорости деградации мРНК провоспалительных генов. Более

того, гипогликемический препарат росиглитазон в экспериментах автора снижал скорость деградации мРНК.

Вторая часть результатов “Анализ изменения ответов при активации системы Толл-подобных рецепторов при адаптации астроцитов к различным факторам внешней среды” методически является продолжением первой части, но связана преимущественно с разными аспектами воспалительных реакций нервной ткани (нейровоспаления). Этот раздел очень большой по объему, и, немного упрощая, логику описанных в нем экспериментов можно свести к следующим этапам. Сначала автор описывает клеточные модели адаптации астроцитов к действию цитокинов, гиалуроновой кислоты, глюкозы и эндотоксина. Затем автор описывает особенности адаптации астроцитов к действию нескольких цитокинов и LPS. При этом описываются профили оксипиринов. Далее автор переходит к характеристике возможных биологических эффектов внеклеточной липидной фракции. Оказалось, что при активации TLR4 на астроцитах внеклеточная липидная фракция обладает нейротоксичностью. То, что астроциты могут играть в ходе воспаления в мозге не только положительную роль, известно давно. Поэтому это результат кажется очень важным. Автор не останавливается на этом наблюдении, углубляя его с помощью ряда потенциально важных с прикладной точки зрения экспериментов. В итоге удалось показать, что свойство липидной фракции можно изменить с нейротоксических на нетоксические может быть изменено с помощью ингибитора 12-липоксигеназы, что сопровождается изменением профиля оксипиринов.

Также автор изучал лигандов ядерных рецепторов PPAR, которые обладают противовоспалительными свойствами и снижают уровень оксипиринов, образующихся через COX-путь. автор обсуждает их использования в качестве регуляторов нейровоспаления.

Наконец, третья часть результатов “Профили оксипиринов как характеристическая подпись при заболеваниях человека” посвящена изучению ряда патологических состояний. Эта часть работы принципиально отличается от остальной диссертации, так как в ней работа велась с клиническим материалом. Как следствие, эта часть работы выглядит более описательной, хотя важность этих данных сомнений не вызывает. Автор показал, что изменение профиля оксипиринов является характеристической подписью при различных патологиях: болезнь Паркинсона, болезнь Вильсона-Коновалова, рак молочной железы и первичная открытоугольная глаукома. Причем, по профилю оксипиринов удастся не только выявлять только наличие заболевания, но и определять степень его прогрессирования. Интересно, что транскриптомный профиль генов метаболизма оксипиринов не соотносится с изменением профиля оксипиринов крови при раке молочной железы и болезни Паркинсона. Напротив, анализ транскрипционных профилей образцов рака молочной железы позволил определить ключевые гены метаболизма оксипиринов, позволяющие характеризовать подтипы рака молочной железы.

Новизна и научная значимость исследования

Представленная работа вносит значительный вклад в понимание механизмов регуляции клеточных процессов в нервной ткани с участием оксипинов, а также роли оксипинов в развитие некоторых патологических состояний (болезнь Паркинсона, болезнь Вильсона-Коновалова, рак молочной железы, глаукома). Работа содержит разделы, которые могут стать основанием для дальнейшего развития разрабатываемого автором диссертационного исследования направления, а также использоваться для решения других вопросов за пределами рамок диссертации.

Замечания

При чтении диссертации и автореферата не выявлено никаких серьезных недостатков или ошибок, но, тем не менее, необходимо сделать только два небольших замечания технического характера. Во-первых, описание макроскопических экспериментов сделано слишком коротко, а иллюстрации недостаточны для верификации данных. Например, на рисунке 3.18А представлены фотографии клеток. При этом, (1) не иллюстрируются контрольные клетки (нет отрицательного контроля), (2) сами фотографии маленькие и непонятные, неясно о каких морфологических критериях идет речь, когда утверждается, что “адаптация клеток к высокой концентрации глюкозы не изменяет морфологию клеток”, и (3) не показано как выглядит эффект, возможен ли эффект в принципе (т.е. отсутствует положительный контроль). Если при проведении микроскопического анализа не производится оценка каких-то количественных характеристик, требования к морфологическому описанию повышаются. Во-вторых, ряд рисунков имеет непозволительно маленький размер. Примером может быть рисунок Г.2 из приложения Г. Я не смог ничего понять из этого рисунка. Эти недоработки досадны, но принципиально не влияют на общую оценку работы. Есть некоторое количество вопросов общего характера, которые хотелось бы обсудить:

1. Первый вопрос, возникающий при чтении работы, - а какое отношение имеют выявленные эффекты к тому, что происходит или может происходить в мозге? *In vitro* модели воспалительных процессов обычно неплохо моделируют отдельные аспекты протекающих реакций, но не процесс в целом. Не говоря уже о том, что воспалительные процессы различаются в зависимости от множества факторов. Можно ли сделать какие-то предположения о процессах в мозге, базируясь на поставленных экспериментах с культурами?

2. В третьей части работы автор приводит данные в пользу того, что “Изменение профиля оксипинов является характеристической подписью при различных патологиях: болезнь Паркинсона, болезнь Вильсона-Коновалова, рак молочной железы и первичная открытоугольная глаукома, выявляя не только наличие заболевания, но и степень его прогрессирования”. Возникает такой вопрос - а эти “характеристические подписи” позволяют решать какие-то реальные диагностические задачи или только отличают используемые выборки пациентов?

Заключение

Работа Чистякова Д.В. является цельным научным исследованием, проведенным на современном уровне. В работе получены новые важные данные, научное и практическое значение работы не вызывает сомнения. По результатам работы опубликовано 22 статьи, включая статьи в престижных биомедицинских журналах. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальностей 1.5.8. - «Математическая биология, биоинформатика» и 1.1.10 - «Биомеханика и биоинженерия» (биологические науки), 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. Чистяков Дмитрий Викторович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.8. - «Математическая биология, биоинформатика» и 1.1.10 - «Биомеханика и биоинженерия» (биологические науки).

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

18 ноября 2024 г.

Шеваль Евгений Валерьевич

Контактная информация:

Адрес места работы: 119991 Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Телефон: 8(495)939-55-28; E-mail: sheval_e@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки)

Подпись д.б.н. Е.В. Шевалья

«Удостоверяю»

Ученый секретарь

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, кандидат биологических наук

18 ноября 2024 г.

И.А. Севостьянова