

**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 и
1.1.10 - Биомеханика и биоинженерия**

Актуальность темы исследования

Поиск подходов к регуляции воспалительного ответа, выявление новых медиаторов воспаления и ключевых элементов внутриклеточных сигнальных путей для разработки новых терапевтических стратегий находятся в фокусе современных исследований в различных областях науки, таких как молекулярная биология, иммунология и нейробиология. Последние годы характеризуются повышенным интересом к использованию “омиксных” подходов к анализу подобных комплексных систем, поскольку они дают перспективные результаты. Актуальность исследования также связана с обращением к изучению астроцитов как клеток неиммунной природы, для которых был показан значимый вклад в развитие воспалительных ответов. Этот класс глиальных клеток мозга, играет одну из ключевых ролей в таких нейропатологиях с воспалительной компонентой, как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера. Роль астроцитов в воспалении, в свою очередь, обусловила повышенный интерес к изучению активации Толл-подобных рецепторов (TLR) на этих клетках. Этот вид рецепторов способен распознавать молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (DAMP), и патоген-ассоциированные молекулярные фрагменты (PAMP), т.е. является важнейшим регуляторным

путем воспалительных ответов, осуществляемых системой врожденного иммунитета. Долгое время исследования были сосредоточены на белковых медиаторах воспаления, таких как фактор некроза опухоли и различные интерлейкины. В то же время почти не изученными в аспекте клеточной регуляции оставались соединения липидной природы, в первую очередь оксилипины, которые являются суперсемейством окисленных производных полиненасыщенных жирных кислот и способны активировать специфические рецепторы, влиять на экспрессию генов на уровне активации транскрипционных факторов. В настоящее время их активно изучают как маркеры воспаления и разрешения воспалительного ответа, окислительного стресса. Соединение в одних исследованиях изучения белков и липидов, осуществленных в данной работе, безусловно, является актуальным направлением. Развитие инструментальных методов, в первую очередь масс-спектрометрии, позволило применять «омиксные» подходы к изучению соединений липидной природы, анализировать совокупность липидных медиаторов (профилей) и выявлять их роль в патологических процессах на различных стадиях. Диссертационное исследование Д.В. Чистякова направлено на изучение роли оксилипинов при клеточном ответе на действие провоспалительных стимулов и активации TLR-сигнальных путей. Актуален шаг, сделанный от клеточных моделей к анализу профилей оксилипинов в крови человека. Перспективен предложенный автором подход, использующий сочетание биоинформатических подходов анализа транскриптомных данных и профилей оксилипинов для идентификации потенциальных биомаркеров для диагностики заболеваний и поиска потенциальных молекулярных мишеней лекарственных средств при различных заболеваниях человека.

Научная новизна результатов и обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту

Новизна данной диссертационной работы не вызывает сомнений. Впервые была получена характеристика ответов астроцитов при активации TLR-сигнального пути на уровне изменения профиля оксипинов, а также установлены характеристики изменений участков внутриклеточных сигнальных путей (MAPK, PPAR, NF- κ B) при соответствующих обработках. Установлено влияние пола животных, используемых при выделении астроцитов, и концентрации сыворотки в культуральной среде на воспалительный ответ; данные результаты особенно важны в методологическом аспекте проведения экспериментов. Впервые для астроцитов охарактеризовано изменение скорости деградации мРНК провоспалительных генов при активации Толл-подобных рецепторов, показано изменение ARE-связывающих белков HuR и TTP. Разработаны и охарактеризованы клеточные модели адаптации астроцитов к действию цитокинов, гиалуроновой кислоты, глюкозы и низким концентрациям эндотоксина. Исследованы восемь низкомолекулярных соединений, перспективных лекарственных соединений по их способности изменять профиль оксипинов при воспалительном ответе, показано, что ингибитор 12-липоксигеназы потенциально может быть нейропротекторным средством при повреждениях ЦНС, а лиганды ядерного рецептора PPAR β эффективными регуляторами нейровоспаления. В ряде клинических исследований впервые были охарактеризованы профили оксипинов при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, болезнь Вильсона-Коновалова, раке молочной железы и первичной открытоугольной глаукоме. Показано, что изменение профиля оксипинов является характеристикой таких заболеваний, кроме того, анализ транскрипционных

профилей образцов рака молочной железы с использованием подходов машинного обучения позволил выявить ключевые гены метаболизма оксипинонов, дающие возможность характеризовать молекулярные подтипы рака молочной железы.

Интересным аспектом работы, ярко отражающим её новизну, является выбор клеток неиммунной природы для изучения системы врожденного иммунитета. Эту систему изучают преимущественно на клетках иммунной системы, хотя известно, что активные TLR-сигнальные пути находятся практически на всех клетках организма и связаны с различными патологиями неинфекционных хронических заболеваний.

Оценка научной и практической значимости полученных результатов, выводов и ключевых положений диссертационной работы

Данная диссертационная работа посвящена установлению взаимосвязей между изменениями в профилях оксипинонов и различными ответами системы врожденного иммунитета, как на моделях клеточных адаптаций, так и при различных заболеваниях. В исследовании было получено много новых данных, показывающих вовлеченность ферментативной системы синтеза оксипинонов в воспалительный ответ. Установлены элементы внутриклеточного сигнального каскада, активируемые при добавлении лигандов Толл-подобных рецепторов, связанные с ферментными системами синтеза оксипинонов.

Полученные данные могут лечь в основу дальнейших фундаментальных исследований по изучению активации систем врожденного иммунитета в неиммунных клетках организма. Важным практическим аспектом представленной работы является два направления, отмеченных автором: изучение влияния низкомолекулярных ингибиторов,

перспективных лекарственных средств, на воспалительный ответ глиальных клеток, что в будущем может послужить основой для создания новых терапевтических подходов для таких заболеваний как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, а также использование профиля оксипинонов крови как маркера патологических состояний, включая как неврологические и онкологические, так и офтальмологические заболевания.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа изложена на 304 страницах и содержит 100 рисунков и 27 таблиц с классической структурой рукописи. Состоит из разделов: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» и приложений. Список литературы включает 6 отечественных и 460 иностранных источников.

В разделе «Введение» описывается актуальность проводимых экспериментов, формулируются цели и задачи исследования, описывается научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, представлены положения, выносимые на защиту. Описан личный вклад автора и публикации по теме диссертации.

В разделе «Обзор литературы» автор представил актуальную на текущий момент информацию об известных оксипинах, их путях биосинтеза и роли во внутриклеточных процессах в организме. Рассмотрено современное представление о врожденном иммунитете и воспалении. Описаны *in vitro* модели адаптации клеток к различным условиям культивирования. Отдельный раздел посвящен изучению

профилей оксипинов в контексте заболеваний, с акцентом на неврологические и онкологические патологии.

В разделе «Материалы и методы» в 17 подразделах содержится подробное описание используемых в работе реагентов, методик и подходов, включая как классические методы молекулярной биологии (ПЦР в реальном времени, вестерн-блот, иммунофлуоресцентный анализ и т.д.), методы масс-спектрометрии, пробоподготовки и экстракции, а также методы биоинформатики и анализа транскриптомных данных.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает подробное описание всех полученных автором результатов. Эксперименты логично разделены на три основных подраздела: 1) изучение молекулярных механизмов клеточного ответа на активацию Толл-подобных рецепторов (TLR) и изменение профиля оксипинов; 2) анализ изменений ответов при активации системы TLR в процессе адаптации астроцитов к различным факторам внешней среды; 3) профили оксипинов как характерная подпись при заболеваниях человека. Все полученные результаты описаны подробно и проиллюстрированы.

В разделе «Заключение» подведен вкратце итог проводимых экспериментов и сделаны основные обобщения. Работа завершается 8 выводами, соответствующими задачам исследования и вытекающими из проведенных экспериментов.

Достоверность результатов исследования

Результаты, представленные в диссертации, получены с использованием современных методов молекулярной биологии и масс-спектрометрии. Для оценки достоверности полученных результатов применены адекватные статистические модели с достаточным количеством

биологических и технических повторов. Обоснованность и достоверность выдвигаемых на защиту положений не вызывают сомнений. Достоверность полученных результатов подтверждается 22 публикациями в ведущих отечественных и зарубежных журналах. Кроме того, исследования были выполнены при поддержке серии грантов РНФ и РФФИ, результаты которых были одобрены экспертными советами соответствующих фондов. Результаты работы также были доложены на российских и международных конференциях.

Замечания

В то же время к работе можно выдвинуть некоторые замечания, пожелания и вопросы дискуссионного характера:

- 1) В тексте присутствует небольшое количество опечаток, например, на стр. 87 поставлены=>поставлены
- 2) Некоторые положения, выносимые на защиту, могли бы быть сформулированы более точно и аккуратно, в том числе чтобы отражать новизну полученных утверждений. Например, первая часть положения 3 «Воспалительный ответ в астроцитах проходит с участием механизмов деградации мРНК» - тривиальное утверждение, деградация мРНК естественный процесс сопровождающий жизнь и развитие любых клеток; в положении 4 не ясно в каком случае происходит активация, а в каком случае образуется толерантность – или они одновременно сосуществуют?
- 3) Интересно было бы обсудить причины различий в ответах на LPS астроцитов полученных из мужских и женских особей. Связано ли это

с различиями в геноме? Находятся ли какие-то гены, отвечающие за иммунный ответ на Y-хромосоме?

4) Термин «характеристическая подпись», как прямой перевод с английского не очень удачен. Аналогичный термин *molecular signature* обычно переводится как молекулярный портрет или набор молекулярных признаков. Кроме того, с сутовой точки зрения не очень непонятно, что является критерием того, является или нет данная характеристика молекулярной подписью? С точки зрения повседневно-бытового понимания, подпись — это что-то уникальное для какого-то объекта. Насколько уникальным являются данные подписи для заболеваний?

5) Термин адаптации применительно к клеткам употребляется в несколько нестандартном значении с точки зрения своего основного определения. Адаптация — это приспособление, то есть процесс. В этой связи «состояние адаптации» кажется противоречивым словосочетанием. Насколько такой термин установился в литературе? Не правильнее ли использовать формулировку «исследовались профили оксипинов в состоянии после адаптации клеток к таким-то и таким-то воздействиям в течение такого-то времени»?

6) Общий вопрос к исследованиям раздела 3.3. В ряде работ автор на основе изменения профилей оксипинов при ряде заболеваний делает предположение о том, что «Полученные данные открывают новые возможные терапевтические мишени и стратегии вмешательства для лечения БВК». Не могут ли изменения профилей оксипинов быть не причиной, а наоборот компенсаторным ответом организма на болезнь с целью снизить ее последствия? В этом случае попытки вернуть профили к норме путем терапевтического

воздействия могут, наоборот, привести к ухудшению течения заболевания?

- 7) Общий вопрос методологического характера. Мы знаем, что многие болезни очень гетерогенны. Так изменение профилей экспрессии генов (дифференциально экспрессируемые гены) часто весьма сильно различаются между исследованиями, что может быть как результатом гетерогенности болезни, так и результатом чувствительности к условиям эксперимента. Как обстоит в этой связи ситуация с исследованиями профилей оксилипинов?
- 8) Общий вопрос методологического характера. Автором показано, что ответ астроцитов может зависеть от пола животного. А насколько он может зависеть от возраста, от других условий? Насколько результаты переносимы на человека? Насколько модели *in vitro* отражают поведение клеток *in vivo*? В каком методологическом направлении нужно двигаться, чтобы от набора фактов на модельных системах, полученных в небольшом количестве условий перейти к комплексному пониманию работы системы врожденного иммунитета у человека *in vivo*?

Заключение

Высказанные замечания не снижают актуальность и значимость проведенного автором исследования, и носят дискуссионный характер. Диссертация соответствует 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" 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. Диссертация 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”.

Официальный оппонент



Шайтан Алексей Константинович
доктор физико-математических наук,
член-корреспондент РАН,
профессор кафедры биоинженерии биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова»

17 ноября 2024 г.

Контактные данные

Телефон: +7(495) 939-57-38; E-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru;

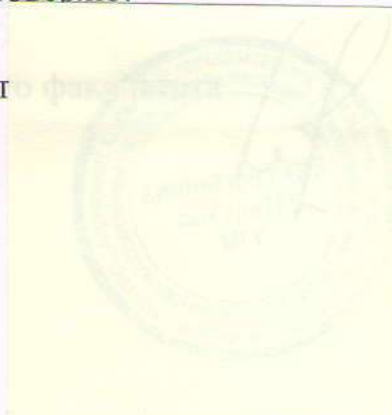
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.09 — Математическая биология, биоинформатика

Адрес места работы: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Тел.: +7(495) 939-57-38; e-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

Подпись сотрудника биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова А.К. Шайтана удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова



Е.В. Петрова