

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Мичуриной Светланы Сергеевны

«Регуляция поглощения и утилизации глюкозы под действием интерлейкина-4 в адипоцитах», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «биохимия»

Актуальность. Метаболические нарушения и прежде всего ожирение образуют группу очень распространенных в мире заболеваний человека, снижающих качество жизни и вызывающих широкий спектр иных патологий (напр., стеатогепатита и фиброза печени). В последние десятилетия количество пациентов с ожирением неуклонно растет из-за снижения физической активности, частого употребления высококалорийной пищи и еды с большим количеством легко доступных питательных веществ (углеводов, жиров и жирных кислот). Кроме того, развитие ожирения тесно связано с развитием воспаления. Во-первых, воспаление появляется в жировой ткани и впоследствии может становиться системным. Во-вторых, хроническое воспаление, сопровождающее многие аутоиммунные заболевания, также способствует прогрессии метаболических нарушений. В качестве примеров можно привести повышение рисков развития ожирения при разнообразных формах артритов. Наконец, в последние годы появляются свидетельства статистически-заметного повышения рисков развития ожирения у пациентов с хроническим гепатитом С (вызываемым онкогенным вирусом, который вызывает хроническое воспаление в печени) после полного излечения инфекции современными противовирусными препаратами. Все эти примеры четко демонстрируют необходимость установления взаимосвязи механизмов регуляции про- и антивоспалительными цитокинами процессов развития ожирения и другими метаболическими расстройствами. Поэтому представленная диссертационная работа имеет очень высокую актуальность, так как существенно расширяет понимание о функциях антивоспалительного цитокина – интерлейкина 4 (ИЛ-4).

Новизна и научная значимость. Научная новизна представленной диссертации состоит в том, что в ней впервые показано, что интерлейкин 4 перестраивает метаболический статус адипоцитов, усиливая одновременно и гликолиз, и дыхательную активность митохондрий. Это демонстрирует отличия от многих клеток иммунной системы, у которых обычно усиление одного из этих процессов сопровождается ослаблением интенсивности другого. Продемонстрировано, что усиление утилизации глюкозы в ответ на интерлейкин 4 опосредовано неканоническим механизмом, так как не

связан с активацией фактора транскрипции STAT6. Кроме того, диссертант впервые обнаружил, что ИЛ-4 активирует липолиз, усиливая и фрагментацию липидных капель и повышая термогенез клеток. Дополнительным элементом новизны является установление участия адipoцитарной триглицеридлипазы (ATGL) в этих процессах. Таким образом, в диссертационной работе впервые охарактеризована функция классического антивоспалительного цитокина в дифференцировке адипоцитов в сторону термогенных бежевых адипоцитов, что представляет вызываемые ими каскады в качестве потенциальных мишенией для фармакотерапии.

Диссертационная работа С.С. Мичуриной выполнена на очень высоком научном уровне с применением современных методов биохимии и молекулярной биологии. Так, анализ метаболического статуса проводился по технологии Seahorse – золотого стандарта в области. Диссидент успешно применял в работе радиоактивно-меченные субстраты (прежде всего глюкозу), что позволило оценить и ее импорт в клетки, и превращения в жирные кислоты и триглицериды, и даже процессы липолиза. К сожалению, в последние полтора десятилетия радиоактивно-меченные вещества вытесняются их флуоресцентными «аналогами», которые могут обладать измененными биологическими свойствами, а также не позволяют достичь той высокой чувствительности, которая свойственна радиоактивным веществам. Ну и конечно, в работе были использованы и методики работы с клеточными линиями, методы РНК-интерференции, визуализации белков иммуноокрашиванием и другие стандартные для физико-химической биологии подходы. Все эти методы обеспечивают достоверность и, как следствие, повышают значимость всего исследования.

По результатам работы опубликовано 8 статей в российских и международных рецензируемых научных журналах, в том числе в *Mitochondrion*, *International Journal of Obesity* и *International Journal of Molecular Science*. Кроме того, результаты были представлены на различных российских и международных конференциях.

Структура диссертации. Диссертация построена по классическому плану и содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, в котором обоснована актуальность и ясно сформулированы цели и задачи исследования, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Заключение, Выводы и список литературы. Работа изложена на 149 страницах и включает 19 рисунков и 1 таблицу, список цитируемой литературы состоит из 333 наименований. Материал диссертации изложен подробно и логично, все разделы взаимосвязаны с друг с другом, все выводы диссертации подтверждены представленными на рисунках результатами экспериментов.

Раздел «Обзор литературы» посвящен изложению современных данных о метаболизме глюкозы и липидов в адипоцитах и принципах его регуляции, вводит в область иммунометаболизма, иллюстрирует взаимосвязь между воспалением и развитием метаболических нарушений при ожирении и о механизмах появления воспаления. В нем также разобраны известные на данный момент функции провоспалительных цитокинов в модулировании основных метаболических параметров, а также представлены существующие подходы к фармакологическому воздействию на метаболические нарушения, направленные на провоспалительные пути. В заключении раздела диссертант анализирует имеющиеся в начале исследований данные о роли изучаемого в работе интерлейкина 4 в регуляции энергетического метаболизма.

Раздел «Материалы и методы» написан очень подробно. Он содержит все использованные в диссертационной работе методики и списки использованных реактивов и расходных материалов. Особенно хочется подчеркнуть, что автор указал для всех реактивов не только фирмы-производители, но и каталожные номера. Это особенно важно для воспроизведения экспериментов с использованием антител, так как многие производители предлагают несколько вариантов антител к конкретному белку. Методики очень подробны и изложены корректно. Таким образом, этот раздел гарантирует воспроизведение всех экспериментов данной диссертационной работы.

В разделе «Результаты» представлены все ключевые данные диссертационной работы. В начале автор показывает, что ИЛ-4 усиливает как гликолитическую, так и дыхательную активности клетки, демонстрирует, что усиление дыхания митохондрий не связано с изменением их массы в клетках или активацией фактора транскрипции STAT6 (наиболее изученной мишени пути ИЛ-4). С.С. Мичурина также четко показывает, что усиление поглощения кислорода и гликолиза не сопровождаются активацией сигнального пути инсулина (IRS/Akt), усилением экспрессии основных транспортеров глюкозы или представленности инсулин-зависимого транспортера на плазматической мембране. Далее диссертант приводит данные о том, что интерлейкин 4 вызывает фрагментацию липидных капель вследствие снижения уровней экспрессии ассоциированных с липидными каплями белков, усиливает липолиз и термогенез. Наконец, в этом разделе работы представлен механизм основных метаболических изменений: автор смог показать, что ключевую роль играет адипоцитарная триглицеридлипазы (ATGL).

Отдельный раздел «Обсуждение результатов» суммирует результаты работы и помещает их в контекст современного состояния исследований в области. В нем диссертант не только соотносит результаты своей работы с результатами исследований других

научных групп, но и делает обоснованные предположения о механизмах воздействия интерлейкина 4 на адипоциты и их метаболизм. Суммирует результаты диссертации представленная на рисунке 19 схема действия IL-4.

Замечания и вопросы в работе. По сути работы замечаний нет никаких замечаний, которые бы ставили под сомнение корректность экспериментов и адекватность сделанных из них выводов. Однако, как и любая интересная работа, диссертация ставит вопросы при ее прочтении:

1. В диссертационной работе продемонстрировано, что интерлейкин 4 усиливает базальную и максимальную дыхательную активности митохондрий, не влияя на их массу. Это следует из отсутствия изменений в уровнях накопления митохондриальных белков, в т.ч. субъединиц респираторных комплексов (Рис.2). Отсюда возникают вопросы о механизмах усиления дыхательной активности в ответ на IL-4: могли ли они быть связаны с появлением т.н. респиросом (дыхательных суперкомплексов) или ассоциацией отдельных митохондрий в сеть (митохондриальный ретикулум)? Проводил ли диссертант анализ морфологии митохондрий?
2. Дыхательная активность митохондрий тесно связана с интенсивностью цикла Кребса, который поддерживается различными метаболическими путями: гликолизом, глутаминолизом, окислением жирных кислот. Транспорт продуктов окисления жирных кислот в митохондрии осуществляется при участии карнитинпальмитоилтрансферазы 1 (CPT1). Для его активности необходим карнитин, уровень которого зависит не только от биосинтеза в клетках, но и импорта поглощаемого карнитина с пищей. Одним из направлений метаболомики в последние годы стало использование культуральных сред HPLM и Plasmax, которые по составу имитируют плазму крови и, как следствие, содержат значительное количество карнитина. В то же время эксперименты в данной диссертационной работе проводились в клетках, которые культивировали в не содержащей карнитин классической среде DMEM. Поэтому возникает вопрос к диссертанту о том, насколько использовании карнитина в качестве добавки в среду может отразиться на данных о роли интерлейкина 4 на метаболический статус адипоцитов.
3. Представленные экспериментальные данные подводят к логичному выводу о том, что интерлейкин 4 можно рассматривать как перспективный агент для борьбы с ожирением. Но в то же время receptor интерлейкина 4 является мишенью терапии бронхиальной астмы и родственных патологий, и моноклональные антитела к этому рецептору (напр., Дупиксент/дупилумаб) разрешены для клинического применения. Как по мнению автора

результаты диссертационной работы могут быть использованы для разработки терапии ожирения?

4. В разделе 3.2. «оценка роли транскрипционного фактора STAT6 в регуляции поглощения глюкозы под действием ИЛ-4» показано, что трансдукция клеток лентивирусами, кодирующими неспецифическую shRNA, ослабляют действие интерлейкина 4. Так как сама трансдукция лентивирусами может сказываться на способность клеток к дифференцировке (показано как минимум на прогениторных клетках печени), не проводился ли в работе анализ влияния лентивирусов и вариантов shRNA на адипоцитарную дифференцировку клеток 3T3-L1?
5. Согласно представленной на странице 51 методике, анализ поглощения глюкозы адипоцитами проводился при ее концентрации около 10 мкМ. С одной стороны, такая концентрация, очевидно, была выбрана, чтобы не разбавлять радиоактивно-меченный препарат глюкозы слишком сильно и не снижать тем самым чувствительность теста. Однако, с другой стороны, эта концентрация сильно ниже, чем константы Михаэлиса для транспортеров глюкозы (Glut1 и Glut4), находящиеся в диапазоне милимолярных концентраций. Как по мнению диссертанта полученные данные соотносятся с реальным транспортом глюкозы в ее физиологических концентрациях?
6. На представленных в разделе «Результаты» графиках автор приводит стандартную ошибку среднего – параметр, который зависит от размера выборки. Хотя в Экспериментальной части указано, что все эксперименты были выполнены трижды с тремя параллелями в каждом, в подписях к рисункам с графиками целесообразно было бы привести размеры выборок ($n=3$ или $n=9$).
7. В Обзоре литературы на странице 41 препарат Этанерцепт не очень корректно назван антителом к фактору некроза опухолей, хотя на самом деле он является растворимым аналогом рецептора данного цитокина. Возможно, диссертант говорил об адалимумабе.
8. Наконец, в качестве пожелания диссертанту можно предложить использование вместо англицизмов вроде «глицерол» их весьма распространенных русских аналогов (напр., «глицерин»).

Тем не менее, стоит особо подчеркнуть, что все эти вопросы и предложения ни в коей мере не ставят под сомнение выводы диссертационной работы, но свидетельствуют о ее актуальности и интересе к ней.

Заключение

Диссертационная работа С.С. Мичуриной выполнена на очень высоком научном и техническом уровне. Она вносит большой вклад в установление взаимосвязи между

метаболическими параметрами адипоцитов (гликолиз и дыхательная активность митохондрий, липолиз и термогенез) и противовоспалительным цитокином интерлейкином 4. Она четко демонстрирует, что данный цитокин усиливает катаболизм глюкозы и липидов, фрагментацию липидных капель и усиливает термогенез. Это расширяет знания в области иммунометаболизма и указывает на IL-4 – зависимые пути как на мишень для создания фармакологических средств для терапии ожирения. Все выносимые на защиту положения обоснованы представленными экспериментальными данными. Все они полностью отражены в публикациях диссертанта. Автореферат точно отражает основное содержание диссертации и выносимые на защиту положения.

Диссертационная работа Мичуриной Светланы Сергеевны «Регуляция поглощения и утилизации глюкозы под действием интерлейкина-4 в адипоцитах» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с последующими изменениями), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций
Федерального государственного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук

 Иванов Александр Владимирович

119991, Москва, ГСП-1, улица Вавилова, дом 32
Телефон: +7-925-068-3630
E-mail: aivanov@yandex.ru

Подпись д.б.н. Иванова А.В. удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
учреждения науки Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
к.в.н.

 Бочаров Александр Анатольевич

«24» апреля 2024 года

