

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Стафеева Юрия Сергеевича на тему **«Воздействие на воспалительный статус адипоцитов как подход к регуляции их чувствительности к инсулину»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Актуальность исследования

Диссертационная работа Стафеева Юрия Сергеевича посвящена оценке влияния воспалительного статуса адипоцитов на системном и клеточном уровне в формировании инсулиновой резистивности, а также возможности регуляции инсулиновой чувствительности адипоцитов путем коррекции их воспалительного статуса. Известно, что в развитых странах ожирение и тесно связанный с ним сахарный диабет второго типа (СД2Т) являются одними из наиболее распространённых заболеваний. Важно отметить, что эти патологические состояния приводят к возникновению многих других заболеваний (заболевания сердечно-сосудистой и двигательной систем, нефропатия и т.д.), что ведет к снижению качества жизни и является одной из основных причин смертности. На сегодняшний день, нарушения функционирования основных сигнальных каскадов, связанные с возникновением инсулиновой резистивности в инсулин-чувствительных тканях (в том числе и в адипоцитах), достаточно хорошо изучены. В тоже время, роль воспаления и, особенно, роль прогениторных клеток, входящих в состав жировой ткани, в регуляции инсулиновой чувствительности адипоцитов остается малоизученной областью. Поэтому тема диссертационной работы Ю.С. Стафеева является крайне актуальной.

Структура и содержание работы

Диссертация написана по традиционной схеме, состоит из *Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и Обсуждения результатов, Заключение и Выводов*; работа изложена на 155 страницах, включает 26 рисунков и 3 таблицы.

Во *Введении* ясно описана актуальность изучаемой проблемы, поставлены цели и задачи, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В *Литературном обзоре* охарактеризованы инсулин-зависимые сигнальные каскады и механизмы активации/ингибирования активности сигнальных молекул, входящих в их состав, как в норме, так и при инсулиновой резистивности. Подробно описаны пусковые механизмы развития воспаления в жировой ткани при ожирении, приводящие к изменению иммунофенотипа жировой ткани. Описаны немногочисленные

данные о роли преадипоцитов – прогениторных клеток жировой ткани, в развитии инсулиновой резистивности. Отдельное внимание посвящено описанию сигнализации и функций цитокина интерлейкин-4 (ИЛ-4); рассмотрена его потенциальная роль в коррекции инсулинорезистивности в жировой ткани, а также вопросы, связанные с использованием различных методов генной терапии для применения гена ИЛ-4 при терапии инсулиновой резистивности. Обзор литературы написан доходчивым языком и обобщает современные литературные данные. Единственное замечание к литературному обзору связано с тем, что в Заключение делается акцент только на последней части обзора литературы – на потенциале использования генно-терапевтического подхода для коррекции иммунофенотипа жировой ткани.

В *методической части* исследования подробно описана организация экспериментов и описаны методы. Хочется отметить, что одной из сильных сторон диссертации является то, что работа была выполнена не только на иммортализованных клеточных линиях адипоцитов, но и на адипоцитах, полученных из мезенхимальных стромальных клеток (МСК) жировой ткани, выделенных из биопсических проб подкожной и сальниковой жировой ткани пациентов с ожирением и инсулиновой резистивностью и пациентов с ожирением (контрольная группа). Доноры ткани были разделены на две группы с сопоставимыми морфофункциональным показателям и значительно различающиеся по инсулиновой чувствительности на уровне организма. Важно отметить, что для корректного разделения на экспериментальную и контрольную группы было проведено трудоемкое и комплексное исследование различных клинических характеристик пациентов (включая измерение инсулиновой чувствительности с помощью гиперинсулинемического эугликемического клэмп теста), а также гистологическое исследование адипоцитов из биопсических образцов ткани. Необходимо подчеркнуть, что в работе использован широкий набор классических и современных молекулярных методов, включающих панорамную масс-спектрометрию и методы генной инженерии. Замечания по этой части работы: 1) в методах не указано на что нормировался сигнал от исследуемых белков при Вестерн блоттинге: референсный белок или общая белковая нагрузка. 2) При проведении ПЦР указана очень низкая температура элонгации. 3) Для более надежной интерпретации результатов ПЦР желательно использовать как минимум два референсных гена.

В главах *Результаты* и *Обсуждение результатов* представлены результаты проведенных экспериментальных исследований, проведен их анализ и сопоставление с данными литературы. На первом этапе работы было показано, что адипоциты из подкожной и сальниковой жировой ткани у пациентов с СД2Т гипертрофированы

относительно пациентов с нормальной глюкозной толерантностью (контроль). При этом адипоциты пациентов с СД2Т имели в 2 раза большую инфильтрацию CD68-позитивными клетками (маркер макрофагов), что свидетельствует о высоком уровне воспаления. При этом у пациентов с СД2Т большее число макрофагов жировой ткани несли на своей поверхности M1-маркеры, по сравнению с контролем, что указывает на провоспалительный фенотип жировой ткани у пациентов с диабетом.

Автор предположил, что повышенный воспалительный фон может оказывать влияние не только на сами адипоциты, но и на МСК жировой ткани. Действительно, было обнаружено, что МСК, полученные из подкожной и сальниковой жировой ткани пациентов с СД2Т демонстрируют нарушение пролиферативной активности, а также пониженную способность к адипогенной дифференцировке (по данным экспрессии генов-маркеров адипогенеза и окраски липофильным красителем), по сравнению с МСК пациентов с нормальной глюкозной толерантностью. Однако, при этом адипоциты, полученные из МСК пациентов с СД2Т демонстрируют большее накопление жировых капель и большие размеры, по сравнению с контролем, а также высокий уровень фосфорилирования киназы JNK1/2, регулирующей один из провоспалительных сигнальных каскадов. Эти данные позволили автору впервые высказать идею о том, что МСК жировой ткани могут играть важную роль в развитии инсулиновой резистивности у людей с ожирением.

На следующем этапе работы была исследована возможность восстановления инсулиновой чувствительности адипоцитов с помощью ИЛ-4. Эта работа была выполненная на линейных клетках 3T3-L1. В предварительных опытах автором было показано, что использование свободных жирных кислот является оптимальной стратегией для индукции инсулиновой резистивности в этих адипоцитах, что связано со снижением уровня фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации (IRS1, Akt, AS160). Опыты с добавлением рекомбинантного ИЛ-4 (50 нг/мл) показали, что ИЛ-4 восстанавливает уровень фосфорилирования этих молекул до уровня контроля и восстанавливает функциональные возможности адипоцитов (инсулин-индуцируемый захват глюкозы).

Поскольку системное применение ИЛ-4 может сопровождаться рядом побочных эффектов, поэтому необходимо исследовать возможность селективной экспрессии ИЛ-4 в жировой ткани. В диссертационной работе был сделан первый шаг для решения этой масштабной задачи. Для этого была исследована эффективность применения гена ИЛ-4 с помощью лентивирусной трансдукции адипоцитов 3T3-L1 с липид-индуцированной инсулиновой резистивностью. Было показано, что созданный лентивирус эффективно

трансдуцирует адипоциты 3T3-L1. Оказалось, что сверхэкспрессия ИЛ-4 эффективна для восстановления уровня фосфорилирования основных участников инсулиновой сигнализации и инсулин-индуцируемого захвата глюкозы. При исследовании механизмов восстановления инсулиновой чувствительности было впервые показано, что в адипоцитах эффекты ИЛ-4, по крайней мере частично, опосредованы его влиянием на уровень фосфорилирования транскрипционного фактора STAT6 и его последующей транслокации в ядро, а также транзитным изменением уровня фосфорилирования IRS1 и Akt. С помощью панорамного масс-спектрометрического протеомного анализа было показано, что добавление ИЛ-4 в среду вызывает увеличение экспрессии белков-регуляторов метаболизма у адипоцитов, в частности, увеличение экспрессии митохондриальных белков.

Экспериментальные результаты описаны и обсуждены подробно и четко. Небольшие замечания по этой части работы связаны с тем, что: 1) часть данных представлена как среднее и стандартная ошибка среднего, а часть как медиана и межквартильный разброс; 2) на графиках с результатами ПЦР в реальном времени не указана размерность измеряемых величин; 3) в результатах отсутствует список белков, изменивших содержание при воздействии ИЛ-4 (представлены только их идентификационные номера).

В главе *Заключение* обобщены основные результаты, подводящие к выводам. Выводы соответствуют положениям, выносимым на защиту.

Диссертационная работа не вызывает серьезных замечаний. Возникает несколько дискуссионных вопросов. Следует отметить, что эти вопросы не являются принципиальными и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

1) Известно, что в лимфоцитах транскрипционный фактор STAT6 может работать как гомо- и гетеродимер с другими факторами этого семейства (например, со STAT2), которые также могут регулироваться через ИЛ-4. Образование гетеродимеров значительно расширяет возможности по регулированию экспрессии STAT-зависимых генов. Известны ли данные о роли других белков семейства STAT (в частности STAT2) и о роли гетеродимеров STAT в регуляции генной экспрессии в адипоцитах?

2) В норме высокая чувствительность к инсулину у адипоцитов нужна для увеличения запасов энергетических субстратов – жиров. При диабете 2 типа на фоне ожирения в адипоцитах наблюдается чрезмерное накопление жиров (гипертрофия адипоцитов) и развивается инсулиновая резистивность. Стоит ли рассматривать возникновение инсулиновой резистивности как адаптацию или, скорее, как срыв адаптационных возможностей?

3) Насколько оправданна в этом случае стратегия восстановления инсулиновой чувствительности (с помощью таргетного увеличения экспрессии ИЛ-4 в адипоцитах): с одной стороны, это должно привести к увеличению экспрессии митохондриальных белков (и, возможно, к увеличению скорости окисления жиров), а с другой стороны к увеличению скорости накопления жиров в гипертрофированных адипоцитах?

4) В работе показано, что адипоциты, полученные из МСК различных доноров (пациенты с ожирением и пациенты с ожирением и диабетом 2 типа), различаются по ряду показателей, то есть, фактически, прогениторные клетки обладают некоторой «памятью». Известен ли механизм, лежащий в основе этого феномена?

5) Известно, что при физической нагрузке работающие скелетные мышцы секретируют множество про- и противовоспалаторных цитокинов (миокинов), в том числе и интерлейкины. Известно ли как действует эти миокины на жировую ткань, а именно на сигнальные каскады, изучаемые в этой работе (инсулин- и JNK-зависимый сигнальные пути)?

Заключение

Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения и открывает перспективное направление для использования полученных результатов в практике медицины. Основные научные результаты диссертации опубликованы в пяти высокорейтинговых рецензируемых научных журналах, цитируемых в базах данных WoS и Scopus. Все опубликованные статьи подготовлены непосредственно диссертантом (первый автор), что подтверждает ключевой вклад автора в диссертационную работу. Автореферат содержит все основные результаты и выводы, полученные в диссертационной работе.

Таким образом, диссертационная работа Юрия Сергеевича Стафеева «Воздействие на воспалительный статус адипоцитов как подход к регуляции их чувствительности к инсулину» является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук (пп. № 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а ее автор заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 биохимия.

Ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего
лабораторией физиологии мышечной деятельности

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Российской Федерации
Института медико-биологических проблем
Российской академии наук,
кандидат биологических наук
по специальности 03.00.13 – «Физиология»



Попов Даниил Викторович

Адрес: 123007, Российская Федерация, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук
Контактный телефон: +7 499 195 6566
e-mail: danil-popov@impb.ru



Подпись к.б.н. Попова Д.В. удостоверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук, доктор биологических наук



Левинских М.А.

04 сентября 2019 г.