

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Сухорукова Василия Николаевича «Взаимодействие проатерогенных дегликозилированных липопротеинов с макрофагами», представленную к защите в диссертационный совет 24.1.180.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 3.3.3 – патологическая физиология

Актуальность избранной темы

Липопротеины крови человека являются сложными наноразмерными комплексами липидов и белков, в том числе гликозилированных, обеспечивающих метаболизм липидов. Интерес к липопротеинам обусловлен прежде всего тем, что их накопление под сосудистой стенкой в макрофагах, перицитах и гладкомышечных клетках является ключевым звеном патогенеза атеросклероза, который приводит к развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Последние не теряют лидирующую позицию среди причин смертности населения в Российской Федерации и в развитых странах мира. В связи с изложенным выше актуальным является исследование причин, вызывающих изменение структурно-функциональных характеристик липопротеинов, приводящих к агрегации частиц и их поглощению клетками под сосудистой стенкой. Следует отметить, что липопротеины являются довольно сложными объектами для анализа, вследствие наличия в плазме крови нескольких фракций и подфракций липопротеинов, различающихся по плотности, а также особенностей белковых, липидных и углеводных компонентов. Следует признать, что несмотря на интенсивные исследования липопротеинов, специалисты до сих пор не сходятся во мнении о первичной причине, приводящей к изменению нативной структуры липопротеинов, накоплению липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в клетках под сосудистой стенкой и снижению эффективности обратного транспорта холестерина липопротеинами высокой плотности (ЛВП). На роль первичной причины проатерогенной модификации липопротеинов претендует процесс десИАлирования. Взаимодействие десИАлированных ЛНП и ЛВП с макрофагами, которое было всесторонне изучено в диссертационном исследовании, имеет как фундаментальное и практическое значение. Если причинно-следственные связи накопления липидов под сосудистой стенкой и развития воспалительной реакции будут установлены, то могут быть предложены эффективные методы профилактики и лечения атеросклероза.

Общая характеристика диссертационного исследования

Диссертация изложена на 125 страницах, построена по традиционному плану, содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Раздел «Список литературы» содержит 237 ссылок на работы, среди которых 16 отечественных, а остальные – зарубежные, преимущественно это публикации последних 20 лет. Результаты диссертационного исследования иллюстрированы 15 рисунками и 16 таблицами. Вынужден отметить, что текст диссертации

насыщен досадными опечатками, части предложения нередко не согласованы, некоторые сокращения состоят из смеси латиницы и кириллицы, это же касается ссылок на источники литературы: [Sukhogikov и др., 2019]. Автор нередко формулирует интересные вопросы, но не использует знаки препинания. В разделе «Результаты» сбита нумерация подразделов, которые идут в порядке: 3.1., 3.2., 3.4., 3.5. (на стр. 53), второй 3.5. (на стр. 57), 3.10. (на стр. 59), второй 3.10. (на стр. 67) и 3.11. Отдельные части рисунков расположены на разных страницах, что также не упрощает задачу ознакомления с интересными результатами диссертации.

В разделе «Введение» автор формулирует проблему высокой частоты смертности по причине сердечно-сосудистых заболеваний, недостаточности средств для профилактики и лечения атеросклероза, отсутствия единого мнения о причинно-следственных связях развития хронического воспаления и накопления в интиме липидов с трансформацией резидентных клеток в пенистые клетки. Цель работы, состоящая в изучении механизмов взаимодействия десиалированных липопротеинов низкой и высокой плотности с макрофагами, представляется обоснованной и актуальной. Задачи, поставленные для достижения обозначенной выше цели, выглядят весьма масштабными для диссертации на соискание ученой степени кандидата наук. Формулировка первой задачи: «Изучить влияние десиалирования на качественные и количественные характеристики гликомов липопротеидов высокой и низкой плотности» оставляет ощущение логической ловушки. **При десиалировании ожидался какой-то иной результат кроме образования асиалогликанов?** Но если бы результат был иным, то изучаемый процесс было бы нельзя назвать десиалированием. Автором использован большой арсенал современных методов аналитической биохимии, молекулярной и клеточной биологии. По мнению оппонента раздел «Личный вклад автора» следовало бы дополнить указанием конкретных лиц, которые помогли соискателю ученой степени с определением гликанового профиля липопротеинов и транскриптомным анализом макрофагов. Безусловно впечатляет количество работ, опубликованных по теме диссертации: 16 статей в рецензируемых журналах, большинство из них – в зарубежных изданиях, а также солидный опыт апробации результатов диссертации на крупных международных конференциях и симпозиумах, посвященных проблемам атеросклероза.

Раздел «Обзор литературы» занимает около одной восьмой объема диссертации, состоит из глав «Атерогенные ЛНП», «Пенистые клетки» и «Заключение». На первой странице обзора литературы меня искренне удивило мнение автора: «В результате была выдвинута гипотеза о необходимости химической модификации ЛНП, чтобы они начали вызывать накопление внутриклеточных липидов. Высказывались предположения о различных модификациях: окисление, взаимодействие с альдегидами, неферментативное гликозилирование, декликозилирование. Большинство из этих модификаций *in vivo* не происходит.». Неведомого «декликозилирования» скорее всего не происходит *in vivo*, но продукты окислительной модификации и взаимодействия с альдегидами были документированы в крупных научных центрах с помощью прецизионных методов, в том числе масс-спектрометрии компонентов ЛНП, выделенных из плазмы крови пациентов с атеросклерозом. Далее автор как будто забывает собственный тезис и пишет: «Окисление циркулирующих нативных ЛНП представляется сложным процессом, зависящим от множества факторов: типа окислителя, степени окисления, присутствия или отсутствия

других агентов, таких как окислительно-восстановительные металлы.». На страницах 14-15 автор подчеркивает неудачность термина «атерогенность»: «Здесь и далее под термином «атерогенность» будет подразумеваться способность ЛНП вызывать накопление внутриклеточных липидов в культуре клеток *in vitro*.». Далее автор приводит интересные данные литературы о вкладе вирусных и бактериальных сиалидаз в десиалирование ЛНП, а также таблицу 1, отражающую сходство различных видов модификации ЛНП практически по всем признакам. В обзоре литературы формулируется гипотеза: «самой первой модификацией, на пути превращения нативных ЛНП в ммЛНП, является по всей видимости десиалирование.». Изменению свойств липопротеинов высокой плотности уделяется одна страница текста, что свидетельствует о необходимости интенсивных исследований в данной области. Вторая часть обзора литературы посвящена пенистым клеткам, в конце этой части автор формулирует интересный вопрос: «Показано, что провоспалительные молекулы усиливают экспрессию скавенджер рецепторов и как следствие ускоряют накопление холестерина. При этом не до конца понятно, может ли провоспалительный ответ клеток приводить к образованию пенистых клеток, а не наоборот.». В заключении по обзору литературы отмечены существенные пробелы в представлениях об изменении экспрессии генов и модуляции сигнальных путей, происходящих при трансформации в пенистые клетки резидентных клеток в интими. Этот подраздел заканчивается предположением, что именно десиалирование ЛНП является первичной атерогенной модификацией и с его помощью следует изучать механизмы образования пенистых клеток.

Раздел «Материалы и методы» приятно поражает глубоким анализом состава липопротеинов, особенно N-гликанов, выделением моноцитов с помощью магнитных частиц с антителами против CD14, трудоемкими методами анализа накопления холестерина макрофагами и ЛВП-опосредованного оттока холестерина, а также использованием техники нокаутирования для выяснения роли ряда генов в ответах клеток на модифицированные липопротеины. Увы, нередко описание методов достаточно лаконично по форме, что обусловлено использованием коммерческих наборов, а раздел «2.7. Определение гликомного профиля липопротеидов.» больше напоминает «подстрочный» перевод, но все же позволяет воспроизвести результаты исследования. Вынужден отметить отсутствие в тексте диссертации нуклеотидных последовательностей siRNA и праймеров, с помощью которых проводили нокаутирование генов и оценивали его эффективность.

Раздел «Результаты» начинается с описания результатов анализа накопления эфиров холестерина культурой клеток THP-1, к которой добавляли нативные и обработанные нейраминидазой (десиалированные) ЛНП. **Не ясно: почему отличаются цифры в тексте на стр. 41 и в подписи к рисунку 2 на стр. 42?** Такое же несоответствие есть на рисунке 1 в автореферате и в тексте на девятой по счету странице.

Автором описан анализ N-гликанов в составе ЛНП и ЛВП, результаты которого отражены на рисунке 3 (к сожалению, его панели представлены на разных страницах) и суммированы в Таблицах 3 и 4. **Не очевидно: зачем автор заменил общепринятое в масс-спектрометрии обозначение «m/z» на «м/з»?**

На рисунках 4 и 5 (к сожалению, их части также представлены на разных страницах) суммированы изменения N-гликанов после обработки ЛНП и ЛВП нейраминидазой. В результате действия десиалирующего фермента закономерно уменьшается доля гликанов, содержащих сиаловые кислоты. В следующем разделе автор приводит данные корреляционного анализа площади отдельных пиков, отражающих гликановый профиль ЛНП (6 контрольных образцов и 6 десиалированных), и индукции такими ЛНП накопления холестерина. **Не ясно: зачем было приводить 36 коэффициентов корреляции в Таблице 5, если значимым является только один из них (пик 16 для десиалированных ЛНП)? Почему пик 9, упомянутый в тексте и на рисунке 6, не выделен жирным шрифтом (как достоверный) в таблице 5?**

Далее приведены интересные данные снижения активности лецитинхолестеринацилтрансферазы после обработки ЛВП нейраминидазой. В следующей части результатов, посвященных корреляционному анализу гликанового профиля ЛВП и опосредованного ЛВП оттока холестерина, приводится большее число достоверных коэффициентов корреляции, **но не ясно: зачем было приводить в таблице 6 недостоверные коэффициенты?** Эта часть результатов заканчивается выводом о положительной роли сиаловых кислот в ЛВП для опосредованного ЛВП обратного транспорта холестерина.

Раздел 3.10. (первый из двух) начинается на стр. 59 с предложения, в котором отсутствует сказуемое: «Для выявления ключевых сигнальных путей, участвующих в фагоцитозе модифицированных ЛНП из культуры клеток первичных макрофагов человека, инкубированных в течение 24 часов с нативными или атерогенными (естественными, выделенными из крови больных атеросклерозом), десиалированными, ацетилированными окисленными) ЛНП или шариками латекса, а также из контрольных макрофагов, не подвергавшимся никакому воздействию.». Для визуализации результатов удачно использованы диаграммы Венна, сложнее ситуация обстоит с Таблицей 8, однако результаты анализа свидетельствуют о том, что на атерогенные ЛНП из крови пациентов с атеросклерозом наиболее похожи именно десиалированные ЛНП. Далее автор установил, что эффективное нокаутирование генов *LDLR* и *INSIG1* влияет на ЛВП-опосредованный отток холестерина и экспрессию генов *ABCA1* и *ABCG1*. В заключительной части результатов автор анализирует влияние нокаутирования потенциальных «мастер-генов» на ЛНП-опосредованное накопление холестерина макрофагами. Замечу, что результаты, представленные в десяти таблицах (№№ 9-18), которые имеют практически одинаковые заголовки, можно было бы гораздо нагляднее представить данные на одной столбчатой диаграмме. Большое достижение автора – доказательство роли генов *IL15*, *IL7*, *IL7R* и *ANXA1* в накоплении макрофагами холестерина, следовательно продукты перечисленных генов могут быть мишенями для фармакологической коррекции.

В разделе «Обсуждение результатов» автор обстоятельно рассматривает соответствие полученных результатов с имеющимися в литературе. И при прочтении этой части диссертации невольно возникает **вопрос: почему нельзя было рассказать в обзоре литературы об N-гликировании, дегликозилирующих ферментах и методах анализа гликомов?**

Достаточно хорошо обсуждаются результаты нокаутирования генов *INSIG1* и *LDLR*, а также результаты анализа «мастер-генов», ответственных за ммЛНП-опосредованное накопление холестерина макрофагами. Обобщающие рисунки 15 и 16 свидетельствуют о глубоком анализе результатов. И в конце автор делает важный вывод о первичности провоспалительного ответа клеток, а не накопления холестерина в процессе патогенеза пенистых клеток.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций сформулированных в диссертации

Положения, выносимые на защиту, вполне соответствуют выводам, сформулированным автором, полностью соответствуют поставленным задачам и подкрепляются полученными результатами. В результате проведенных исследований автор рекомендует с большей осторожностью использовать традиционные метода модификации липопротеинов *in vitro*, что подтверждается анализом сигнальных путей, активируемых в макрофагах, фагоцитирующих различные виды модифицированных ЛНП.

Достоверность и научная новизна работы заключается в том, что впервые в репрезентативной выборке образцов ЛНП и ЛВП был определен их гликомный профиль, проведен корреляционный анализ степени сиалирования липопротеинов и индуцированного липопротеинами накопления либо обратного транспорта холестерина, впервые проведен анализ генов, нокаутирование которых в макрофагах повлияло на накопление и обратный транспорт холестерина. Достоверность полученных результатов и выводов подкрепляется достаточным числом независимых экспериментов, использованием адекватных методов статистической обработки экспериментальных данных, а также корректной интерпретацией результатов диссертационного исследования. Следует отметить, что о достоверности результатов свидетельствуют многочисленные публикации автора по теме диссертации в высокорейтинговых рецензируемых журналах.

Оформление диссертации и автореферата

Содержание автореферата в полной мере отражает содержание диссертации. Недочеты оформления диссертации были изложены в разделе «Общая характеристика диссертационного исследования».

По результатам знакомства с диссертационной работой возникли следующие вопросы:

1. Для десиалирования препараты липопротеинов встряхивали в течение 16 часов при 37 °С, но не указано – проводилась ли эта реакция в инертной атмосфере? Если кислород не удалялся, то оценивалась ли концентрация продуктов окислительной модификации липопротеинов? Контролировалось ли отсутствие нейраминидазы в препарате липопротеинов в конце обработки?

2. Десиалирование белков плазмы крови сопровождается быстрой элиминацией таких белков из кровотока с помощью асиалорецепторов гепатоцитов. Реализуется ли такой механизм элиминации для десиалированных липопротеинов?

Данные вопросы носят дискуссионный характер и не снижают высокой оценки проведенных автором исследований.

Заключение

Диссертационная работа Сухорукова Василия Николаевича «Взаимодействие проатерогенных дегликозилированных липопротеидов с макрофагами», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 3.3.3 – патологическая физиология, является завершенной научно-квалификационной работой, которая решает актуальную научную задачу исследования ключевой роли десалирования липопротеинов как проатерогенной модификации. По актуальности, объёму выполненных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов настоящая работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней...», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04. 2016 г. № 335), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор – Сухоруков Василий Николаевич, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.3 – патологическая физиология.

Старший научный сотрудник

Научно-исследовательского отдела биохимических исследований

Центра доклинических и трансляционных исследований

Института экспериментальной медицины

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А.Алмазова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Д.б.н.

Соколов Алексей Викторович

«07» апреля 2022 г.

197375, Санкт-Петербург, Долгоозерная ул., д. 43

Тел: +7-911-967-05-94

http://www.almazovcentre.ru/?page_id=35744

E-mail: biochemsokolov@gmail.com

