

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Мишра Апурвы «Метаболическая активность клеток адипогенной дифференцировки», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 1.5.4 – биохимия и 1.5.22 – клеточная биология.

Актуальность темы исследования

Патология жировой ткани сопровождается увеличением индекса массы тела, и развитием ожирения и/или СД2. Ожирение настолько распространено в современном обществе, что термин “globesity” (глобальное ожирение) был придуман в англоязычном мире, чтобы подчеркнуть масштабы, в которых оно уже оказывает и продолжает оказывать влияние на человечество. Согласно данным, опубликованным в 2016 году, 2 миллиарда человек во всем мире имеют избыточный вес, из которых 650 миллионов страдают ожирением. По некоторым прогнозам, Россия наряду с США, Китаем, Бразилией и Индией входит в топ-5 стран, которые больше всего пострадают от ожирения и сопутствующих заболеваний к 2025 году.

Представления о биологии адипоцитов радикально изменились с момента открытия адипокинов – секретируемых адипоцитами цитокинов, таких как лептин и адипонектин (1990–е годы). Эта весьма разнообразная группа пептидов, обладают аутокринными, паракринными, а также эндокринными эффектами. Еще одним ключевым событием стало открытие в 2010-х годах функциональных бурых и бежевых адипоцитов у взрослых людей. Первоначальные исследования установили миогенное происхождение бурых адипоцитов. Бежевые адипоциты, в свою очередь, являются продуктами трансдифференцировки белых адипоцитов при адренергической стимуляции. Ключевые различия в их морфологии, эволюционной функции и

происхождении в процессе развития, особенно в контексте дисфункции жировой ткани, все еще остаются загадкой.

Отсутствие модели *in vitro* для бурых и бежевых адипоцитов человека было одним из основных препятствий в определении сходств и различий между этими 3 типами адипоцитов. Бежевые адипоциты обычно обнаруживаются рассеянными среди белых адипоцитов в пределах белой жировой ткани, в то время как бурая жировая ткань расположена в очень специфических анатомических местах. Из-за их расположения и относительно небольшого количества выделение бежевых и бурых адипоцитов человека является крайне непростой задачей. Большая часть того, что известно об этих новых адипоцитах, получена путем анализа биопсий или изменений уровня различных белков в сыворотке.

В этом исследовании белые и буроподобные (MYF5+/-) адипоциты были дифференцированы из мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из липоаспираатов человека. Чтобы получить более глубокое понимание их функциональности, эти клеточные культуры обрабатывали патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (РАМР), и миокинами. Известно, что РАМР, являющиеся агонистами Toll-подобных рецепторов (TLR), которые инициируют врожденный иммунный ответ, и миокины, секретируемые скелетными мышцами, влияют на метаболизм белой жировой ткани. Оценивали их влияние на буроподобные адипоциты на уровне транскрипции генов, секреции белков и синтеза липолитических факторов.

Таким образом, тематика и объект исследования, а также использованные методические приемы являются актуальными и вносят вклад в современное знание о метаболизме, гистогенезе и функции жировой ткани.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

С помощью проточной цитометрии автор подтвердил успешное выделение МСК из липоаспираатов человека. Адипогенез визуализировали на различных этапах протокола дифференцировки с использованием фазовой контрастной и конфокальной микроскопии. Культивирование 3 различных культур адипоцитов было качественно определено по наличию известных термогенных факторов транскрипции. Успех этих протоколов был дополнительно подтвержден способностью всех адипогенных клеточных культур секретировать адипокины, такие как лептин и адипонектин, и демонстрировать признаки активного липолиза – отличительного признака функции адипоцитов. Секреция адипоцитов и синтез гормоночувствительной липазы (HSL) отсутствовали в культурах МСК, полученных из жировой ткани. Наконец, чтобы исследовать патологию, связанную с жировой тканью, автор инкубировал МСК, а также культуры адипоцитов с РАМР и миокинами. Используя РТ-ПЦР, вестерн-блот и мультиплексный ИФА, автору удалось исследовать изменения, претерпеваемые дифференцирующимися МСК во время адипогенеза,

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 151 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 36 рисунками и 27 таблицами. Указатель литературы содержит 241 публикацию, из них 4 отечественных и 237 зарубежных.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Предыдущие исследования культивируемых бурых адипоцитов человека (в контексте известной биологии адипоцитов) основывались на биопсиях тканей, взятых из разных анатомических мест. Это оказалось ненадежным, поскольку функциональность адипоцитов в значительной

степени зависит от их исходного микроокружения. Автору удалось обойти эту проблему, используя МСК в качестве исходного материала и индуцируя их белыми и бурыми адипогенными факторами. Превосходящая метаболическая активность буроподобных адипоцитов по сравнению с белыми адипоцитами была визуализирована с помощью визуализации митохондриального биогенеза. Кроме того, две различные популяции буроподобных адипоцитов были идентифицированы по наличию хорошо известного фактора транскрипции «браунинга» - Myf5.

Интактные культуры белых адипоцитов секретировали более высокие уровни классических адипокинов (лептина и адипонектина) по сравнению с буроподобными адипоцитами. Они были более чувствительны к действию PAMP, отвечая значительным изменениям экспрессии TLR и провоспалительных цитокинов. Секреция провоспалительных цитокинов была усилена в культурах белых адипоцитов по сравнению с буроподобными адипоцитами при стимуляции PAMP. Из факторов роста, проанализированных с помощью мультиплексного ИФА, интактные буроподобные адипоциты секретировали более высокие уровни нейротрофического фактора (NGF) по сравнению с МСК и белыми адипоцитами. Адипогенная дифференцировка МСК активировала процесс липолиза, что оценивали по выработке важнейшего липолитического фермента HSL. Количество активированной формы фермента (HSL-Ser552) в интактных белых адипоцитах было намного выше, чем в обеих культурах буроподобных адипоцитов, что указывает на более высокую липолитическую активность на базальном уровне. Стимуляция PAMP повышала уровни HSL-Ser552 в белых и бурых культурах MYF5(+) адипоцитов.

В целом, экспериментальный дизайн текущего исследования продемонстрировал большое техническое мастерство соискателя. Исследование проведено на достаточном объеме материала (22 донора), и

достоверность результатов работы не вызывает сомнения. Сравнения трех различных адипогенных культур, были проведены с использованием различных методик и дополнительно расширены за счет использования агонистов TLR и миокинов. Результаты исследования (в 36 рисунках и 27 таблицами) представлены с использованием адекватных методов визуализации, анализа и статистической обработки. Настоящее исследование обладает большим потенциалом; улучшая понимание фундаментальных различий между адипоцитами, обнаруженными у млекопитающих, и влиянием их микроокружения, а также влияния экзогенных стимуляторов на их функционирование. Выводы сформулированы корректно, соответствуют результатам исследования и согласуются с задачами диссертации. После изучения диссертационной работы возникли следующие замечания и вопросы дискуссионного и уточняющего характера:

1) Подписи к рисункам не всегда сопровождаются описанием методов, с помощью которых они были получены.

2) Почему была использована терминология MYF5 (+/-) вместо бежевых и бурых адипоцитов?

3) Как вы интерпретируете увеличение нейротрофических факторов (BDNF и NGF) в супернатантах буроподобных адипоцитов? Почему культуры MCK и белых адипоцитов не показали существенных изменений?

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Мишра Апурвы «Метаболическая активность клеток адипогенной дифференцировки» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Шестопалова Александра Вячеславовича и член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора, Румянцева Сергея Александровича,

содержащей новое решение актуальной научной задачи – исследование секреторной и метаболической активности клеток адипоцитов различной дифференцировки при стимуляции РАМР и миокинами.

Диссертация Мишра Апурвы полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., № 650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г.)

Руководитель лаборатории
клеточной биологии
ФГБУН Институт биологии развития
им. Н. К. Кольцова РАН
член-корр. РАН,
доктор биологических наук

18 ноября 2022 г.

Воротеляк Екатерина Андреевна

Подпись Воротеляк Е. А. заверяю
Ученый секретарь
ИБР РАН, к.б.н., доцент

Хабарова М.Ю.



Данные об оппоненте:

Воротеляк Екатерина Андреевна – доктор биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, член-корреспондент РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д..26, +7(499) 135-40-81, info@idbras.ru, vorotelyak@yandex.ru